58
Т56

В. В. Томилин, А. С. Гладких

Судебно-медицинское исследование крови

В. В. Томилин, А. С. Гладких

Судебно-медицинское исследование крови

в делах о спорном отцовстве, материнстве и замене детей

Москва: Медицина. 1981

58
УДК 340.64-055.52-055.1:340.624.41

ТОМИЛИН В. В., ГЛАДКИХ А. С. **Судебно-медицинское исследование крови в делах о спорном отцовстве, материнстве и замене детей.** — М.: Медицина, 1981, 240 с.

В. В. Томилин — заслуженный деятель науки РСФСР, доктор медицинских наук, профессор. **А. С. Гладких** — кандидат медицинских наук.

В монографии представлены современные данные о генетически обусловленном наследственном групповом полиморфизме эритроцитарных, сывороточных, ферментных и лейкоцитарных систем крови человека, о порядке и особенностях наследования антигенов некоторых из этих систем с учетом действия так называемых «немых» генов и генов-супрессоров. Приведены сведения о частоте встречаемости антигенов этих систем крови, дана оценка различной степени полиморфности, показана их значимость в аспекте максимальной вероятности исключения отцовства для той или иной популяции. Уделено внимание срокам формирования различных групп крови в онтогенетическом развитии, что имеет определенное значение при проведении экспертиз при ранних сроках жизни ребенка. Рассмотрено влияние предшествующего переливания иногруппной донорской крови на антигенную характеристику крови ребенка.

Описаны современные иммунологические, серологические, биохимические и электрофоретические методы групповой диагностики эритроцитарных, сывороточных, ферментных и лейкоцитарных систем крови и возможные при этом экспертные ошибки. Даются методические рекомендации при проведении таких экспертиз.

Рассчитана на судебно-медицинских экспертов.

В книге 22 рис., 20 табл., библиография 286 названий.

Томилин Виталий Васильевич, Гладких Андрей Степанович

СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ

Редактор **Е. А. Гоголина.** Художественный редактор **Л. М. Воронцова.** Переплет художника **С. Н. Томилина.** Технический редактор **О. Н. Афонькина.** Корректор **Л. В. Петрова**

ИБ — 2597

Сдано в набор 29.01.81. Подписано к печати 08.05.81. Т—10701. Формат бумаги 84×108 1/32. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Печать высокая. Усл. печ. л. 12,60. Усл. кр.-отт. 12,60. Уч.-изд. л. 14,06. Тираж 7000 экз. Заказ № 1232. Цена 1 р. 50 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина», Москва, Петроверигский пер., 6/8

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома Государственного комитета СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1

Т $\frac{52200-276}{039(01)-81}$ 155—81. 4126000000.

© Издательство «Медицина». Москва. 1981.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3

Раздел I. **ИЗОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА** 5

Глава 1. **Система АВ0** 5

Глава 2. **Система MNSs** 15

Глава 3. **Система Р** 20

Глава 4. **Система резус** 23

Глава 5. **Система Келл—Челлано** 49

Глава 6. **Система Лютеран** 53

Глава 7. **Система Даффи** 57

Глава 8. **Система Кидд** 60

Глава 9. **Система Xg** 62

Раздел II. **СЫВОРОТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ** . . . 66

Глава 10. **Система гаптоглобина** 66

Глава 11. **Системы иммуноглобулинов** 75

Система Gm 80

Система InV 98

Глава 12. **Система группоспецифического компонента (Gc)** 103

Глава 13. **Системы липопротеинов** 115

Система Ag 116

Система Ld 120

Глава 14. **Система трансферрина** 121

Глава 15. **Система С3 (посттрансферринов)** 129

Глава 16. **Система С4** 135

Раздел III. **ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ** 142

Глава 17. **Система эритроцитарной кислой фосфатазы** . 143

Глава 18. **Система эритроцитарной фосфоглюкомутазы** . 148

Глава 19. **Система эритроцитарной аденилаткиназы** . . 158

Глава 20. **Система эритроцитарной фосфоглюконатдегидрогеназы** 165

Глава 21. **Система эритроцитарной аденозиндезаминазы** 170

Глава 22. **Система эритроцитарной глутамат-пируват-аминотрансферазы** 175

Глава 23. **Система эритроцитарной эстеразы D** . . . 181

Глава 24. **Система эритроцитарной глиоксалазы I** . . 185

Глава 25. **Система щелочной фосфатазы сыворотки крови человека** 189

Раздел IV. **СИСТЕМА АНТИГЕНОВ HLA** 197

Раздел V. **ГРУППЫ КРОВИ И ГЕМОТРАНСФУЗИЯ** . . 206

Раздел VI. **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ СИСТЕМ КРОВИ** 210

Список литературы 226

ВВЕДЕНИЕ

Судебно-медицинская экспертиза спорного отцовства, материнства и замены детей основана на строго определенном генетически детерминированном порядке наследования групповых антигенов многочисленных и весьма разнообразных эритроцитарных (изосерологических), сывороточных, ферментных и лейкоцитарных систем крови. Благодаря значительным успехам молекулярной и биохимической генетики, иммунологии и серологии возможности этого вида экспертизы в последние годы существенно возросли. Одновременно повысились и требования к квалификации экспертов, проводящих подобные исследования. Они должны теперь не только обладать глубокими знаниями в области современной генетики, но и быть в курсе многочисленных особенностей наследования групповых факторов крови, используемых в качестве достоверных генетически обусловленных маркеров для установления возможности происхождения ребенка от определенной родительской пары.

Как известно, исследование групповых факторов крови в делах о спорном отцовстве и материнстве позволяет в настоящее время лишь исключить ответчика, фигурирующего в процессе в качестве возможного отца или матери ребенка. Причем вероятность такого исключения во многом зависит от количества исследованных групповых антигенов крови у всех заинтересованных в деле лиц: матери, ребенка, предполагаемого отца. Современный уровень развития серологии теоретически позволяет производить 100% исключение отцовства мужчин, ложно указанных в качестве отца ребенка. Однако на практике такая возможность значительно ниже и во многом определяется количеством систем (эритроцитарных, сывороточных, ферментных, лейкоцитарных), по которым в данном экспертном учреждении может быть типизирована групповая харак-

теристика крови проходящих по делу лиц. Естественно, чем больше будет исследовано генетических маркеров крови, тем выше вероятность исключения ложно указанного отца. Последнее во многом зависит от квалификации судебно-медицинских экспертов, наличия соответствующей аппаратуры, реактивов, сывороток.

Авторы поставили своей целью осветить современное состояние экспертизы спорного отцовства, материнства и замены детей, имеющей большое значение в экспертном обеспечении выполнения Основ законодательства Союза ССР и союзных республик о браке и семье. Необходимость написания такой работы вызвана тем, что в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют монографии, посвященные этому виду экспертизы. Имеющиеся же в мировой литературе данные относительно методов исследования и оценки полученных результатов иногда весьма противоречивы, что затрудняет использование их в экспертной практике и сказывается на качестве экспертиз.

Раздел I
ИЗОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Глава 1
СИСТЕМА АВ0

Антигены системы АВ0. Изосерологическая система АВ0, открытая в 1900 г. К. Ландштейнером, насчитывает четыре основных антигена: A_1, A_2, В и 0, в соответствии с которыми различают 6 фенотипов: A_1, A_2, 0, В, A_1В и A_2В. Кроме основных антигенов системы, имеется большое количество крайне редких их разновидностей: A_3, A , A_4, A_5, A_x, A_o, A_m, A_{End}, A_p, A_{bantu}, A_h, B_2, B_3, B_w, B_x, В-слабый. Они отличаются друг от друга и могут быть выявлены с помощью определенных серологических реакций.

Внутри группы 0(I) имеются подгруппы 0_1 и 0_2, причем антиген 0_1 доминирует над антигеном 0_2. Серологическим реагентом, дифференцирующим эти подгруппы, является иммунная антисыворотка, полученная путем иммунизации кур почечным экстрактом морских свинок.

Генетические концепции системы АВ0. Наличие многочисленных довольно редких антигенов системы АВ0, главным образом в группе А(II) и реже в группах В(III) и 0(I), передающихся по наследству, свидетельствует о том, что в генном локусе этой системы, помимо основных аллелей A^1, A^2, B и 0, действует и ряд других, по-видимому, крайне редких аллелей, обеспечивающих генетическую реализацию перечисленных выше атипичных антигенов системы.

До открытия в 1930 г. на основе многочисленных семейных обследований и исследований пар мать — ребенок генетически обусловленных подгрупп A_1 и A_2 в группе А(II) господствовала трехаллельная генетическая концепция передачи по наследству групповых антигенов (или факторов) А, В и 0. Согласно этой концепции, у каждого человека в соответствующих генных локусах парных хромосом имеется пара одинаковых (*AA*, *BB*, *00*) или пара различных (*AB*, *A0*, *B0*) аллелей, полученных по одному от отца и матери. Гены *A* и *B* занимают одинаковое положение (кодоминантные гены), но доминируют над геном *0* (кото-

рый является по отношению к ним рецессивным), поэтому кровь человека, получившего от одного родителя ген *A*, а от другого *0* (генотип *A0*), фенотипически проявляется группой A(II), точно так же генотип *B0* соответствует группе B(III).

Исходя из теории наследования генетически обусловленных признаков, потомку передается лишь один из пары генов, контролирующих тот или иной признак, второй же теряется при расщеплении хромосом. Совокупность генов, полученных индивидом от отца и матери, обусловливает генотип потомка. Таким образом, группа, или фенотип (внешнее проявление генотипа или непосредственная реализация генетически обусловленных свойств индивида), крови 0(I) имеет лишь один генотип *00*, также один генотип *AB* имеет группа крови AB(IV). Что же касается групп крови A(II) и B(III), то, согласно трехаллельной теории, они могут генотипически характеризоваться соответственно как *AA* или *A0* и *BB* или *B0*.

Основной закон теории наследования Менделя, полностью относящийся и к наследованию групповых факторов крови, гласит, что у детей могут оказаться лишь те гены, которые имеются у родителей, и, следовательно, не может быть такого свойства, которого нет хотя бы у одного из них. Поэтому у родителей 0×0 не может быть ребенок со свойствами A или B. С другой стороны, у детей могут отсутствовать свойства (гены), имеющиеся у одного или даже у обоих родителей. Так, например, в родительской паре A×B (при родительских генотипах *A0* и *B0*) могут родиться дети с группой крови 0(I), т. е. не имеющие родительских свойств *A* и *B*. Если оба родителя или один из них относится к группе 0(I), то у них не могут родиться дети с группой крови AB(IV), и, наоборот, при наличии группы крови AB(IV) у двух или одного из родителей у ребенка, родившегося в этой семье, не может быть группы 0(I).

Для своего времени трехаллельная теория наследования групп крови системы AB0 была исключительно полезной, поскольку она давала четкое представление о наследовании групповых факторов A, B и 0. Исходя из основных положений теории Бернштейна и законов наследования Менделя, могли быть составлены таблицы, отражающие возможные фенотипы системы AB0 у детей в зависимости от фенотипа родителей (табл. 1).

В настоящее время доказано, что в аутосомальном ген-

Таблица 1

Возможные фенотипы системы АВ0 у родителей и их детей

Брачные комбинации	Дети	
	могут быть	не могут быть
0×0	0	A, B, AB
0×A	0, A	B, AB
0×B	0, B	A, AB
0×AB	A, B	0, AB
A×A	A, 0	B, AB
A×B	0, A, B, AB	
A×AB	A, B, AB	0
B×B	B, 0	A, AB
B×AB	B, AB, A	0
AB×AB	A, B, AB	0

ном локусе, контролирующем полиморфизм системы АВ0, взаимоотношение между четырьмя основными аллелями следующее: ген A^1 доминирует над геном A^2, ген A^2 — над геном *0*, являющимся абсолютно рецессивным. В то же время аллели A^1 и *B*, так же как и аллели A^2 и *B*, по отношению друг к другу являются кодоминантными. Исходя из этого, можно заключить, что фенотипы A_1B, A_2B и 0 имеют единственно возможные генотипы A^1/B, A^2/B и $0/0$, а фенотипы A_1, A_2 и B могут характеризоваться следующими генотипическими сочетаниями: A^1/A^1, A^1/A^2, $A^1/0$, A^2/A^2, $A^2/0$, B/B и $B/0$.

На одном примере покажем важность знания экспертом точных генотипов проходящих по делу лиц для решения вопроса о возможности или невозможности рождения ребенка от конкретной родительской пары. Ответчик имеет фенотип A_1, мать ребенка — 0. Теоретически от данной пары возможно рождение детей с фенотипами A_1, A_2 и 0. Но это не так. В действительности же в браках $A_1 \times 0$ могут родиться дети с одним или максимум с двумя из трех перечисленных фенотипов. Если у отца генотип A^1/A^1, а у матери $0/0$, то их дети могут иметь только фенотип A_1 (генотип $A^1/0$). При генотипе отца A^1/A^2 возможно рождение детей с группами A_1 и A_2 (генотипы $A^1/0$ и $A^2/0$). При генотипе отца $A^1/0$ возможно рождение детей с группами A и 0 (генотипы $A^1/0$ и $0/0$).

В табл. 2 представлены различные возможные комбинации групп крови у родителей (с учетом подгрупп A_1 и A_2) и все возможные группы крови их детей. При этом надо учитывать, что если в графе родительской пары

Таблица 2

Наследование антигенов A_1, A_2, B и 0

Брачные комбинации	Группы крови, которые могут иметь дети
0×0	0
$A_1 \times 0$	$A_1 0$, A_2
$A_2 \times 0$	A_2, 0
$B \times 0$	B, 0
$A_1B \times 0$	A_1, B
$A_2B \times 0$	A_2, B
$A_1 \times A_1$	A_1, 0, A_2
$A_2 \times A_1$	A_1, 0, A_2
$B \times A_1$	A_1, A_2 B, 0, A_1B, A_2B
$A_1B \times A_1$	A_1, B, A_1B, A_2B
$A_2B \times A_1$	A_1, A_2, B, A_1B, A_2B
$A_2 \times A_2$	A_2, 0
$B \times A_2$	B, 0, A_2, A_2B
$A_1B \times A_2$	A_1, A_2B, B
$A_2B \times A_2$	A_2, A_2B, B
$B \times B$	B, 0
$A_2 \times B$	A_1, B, A_1B
$A_2B \times B$	A_2, B, A_2B
$A_1B \times A_1B$	A_1, B, A_1B
$A_2B \times A_1B$	A_1, B, A_1B, A_2B
$A_2B \times A_2B$	A_2, B, A_2B

$A_1 \times B$ указывается возможность рождения детей со всеми шестью группами, то она вытекает лишь из общего числа всех детей, родившихся в многочисленных семьях с такой комбинацией групп крови, и подразумевает наличие в таких семьях всех возможных генотипических сочетаний. В конкретной же родительской паре $A_1 \times B$, естественно, могут родиться дети с ограниченным числом фенотипов, зависящим от генотипа матери и отца. Это в равной мере относится и к другим графам табл. 2.

Для экспертного решения вопроса о истинном отце ребенка необходимо по возможности выяснить генотип матери и предполагаемого отца, что в ряде случаев по фенотипу групп их крови не представляется возможным. В таких случаях целесообразно провести исследование групп крови родителей матери и предполагаемого отца, а также определить группы крови братьев и сестер ребенка, происхождение которого устанавливается.

Приведем пример. Муж имеет группу A_1, жена — B, группа крови оспариваемого ребенка — 0. В этом случае без учета генотипа матери ребенка и ее мужа, выступающего в роли ответчика, отцовство последнего в отношении данного ребенка не может быть исключено. Однако в данной семье был еще один ребенок, происхождение которого от этого брака не оспаривалось. Установление его группы крови, оказавшейся A_2, в данном случае позволило точно определить генотипы мужа и жены и по их генотипическому набору исключить мужа как биологического отца второго ребенка с группой крови 0. Действительно, рождение в браке A_1 и B ребенка A_2 показывает, что генотип

одного из родителей (отца) может быть только A_1A_2, а другого (матери) — только *B0*. Рождение же матерью второго ребенка с группой крови 0 (генотип *00*) доказывает, что отцом этого ребенка мог быть только какой-то другой мужчина, передавший ему аллель *0*, и исключает мужа в качестве биологического отца второго ребенка.

В последнее время появились работы, открывающие принципиально новые возможности установления генотипов системы АВ0 у половозрелых мужчин. Предпосылками к ним явились данные B. Gollbring (1957), который методом смешанной агглютинации дифференцировал сперматозоиды мужчин с группой АВ на носителей антигена А или В. Эти данные были подтверждены работами R. Popivanon и X. H. Vulchanov (1962). С помощью сыворотки анти-А авторы показали возможность установления генотипов A^1/A^1 и $A^1/0$ у мужчин с группой A_1 по сперматозоидам.

Особые генетические феномены в системе АВ0. Открытие многочисленных подгрупп в группе А, а позднее и в группе В позволило предположить, что существование таких подгрупп обусловлено действием особых регуляторных генов, не связанных с обычными структуральными генами, генотипическими продуктами которых являются соответствующие антигены. J. J. Loghem и van der M. Hart (1954) описали необычный феномен рождения ребенка A_4 от родителей с группой 0. A. S. Wiener и E. B. Gordon (1956) пролили свет на этот необычный генетический феномен, описав семью, к которой была приложима гипотеза о наследственной передаче особого рецессивного гена *y*. Этот ген в гомозиготной форме *y/y* у лиц с группой А тормозит выработку антигена А в эритроцитах. В то же время этот «супрессорный» рецессивный ген не влиял на лиц — носителей субстанций В и 0.

Теория регуляторных генов в дальнейшем была перенесена и на генетические феномены в группе В. Действующие в ней регуляторные гены, названные *Xx*, обусловливают генетический феномен, известный под названием «тип Бомбей». Этот тип характеризовался отсутствием в эритроцитах антигенов А, В и 0 и присутствием в сыворотке антител: анти-А, анти-В и анти-Н. Из рис. 1 видно, что носитель типа Бомбей (обозначенный стрелкой) генотипически должен быть носителем В. Интересно, что все члены семьи с типом Бомбей являются Le (a+), т. е. невыделителями АВН.

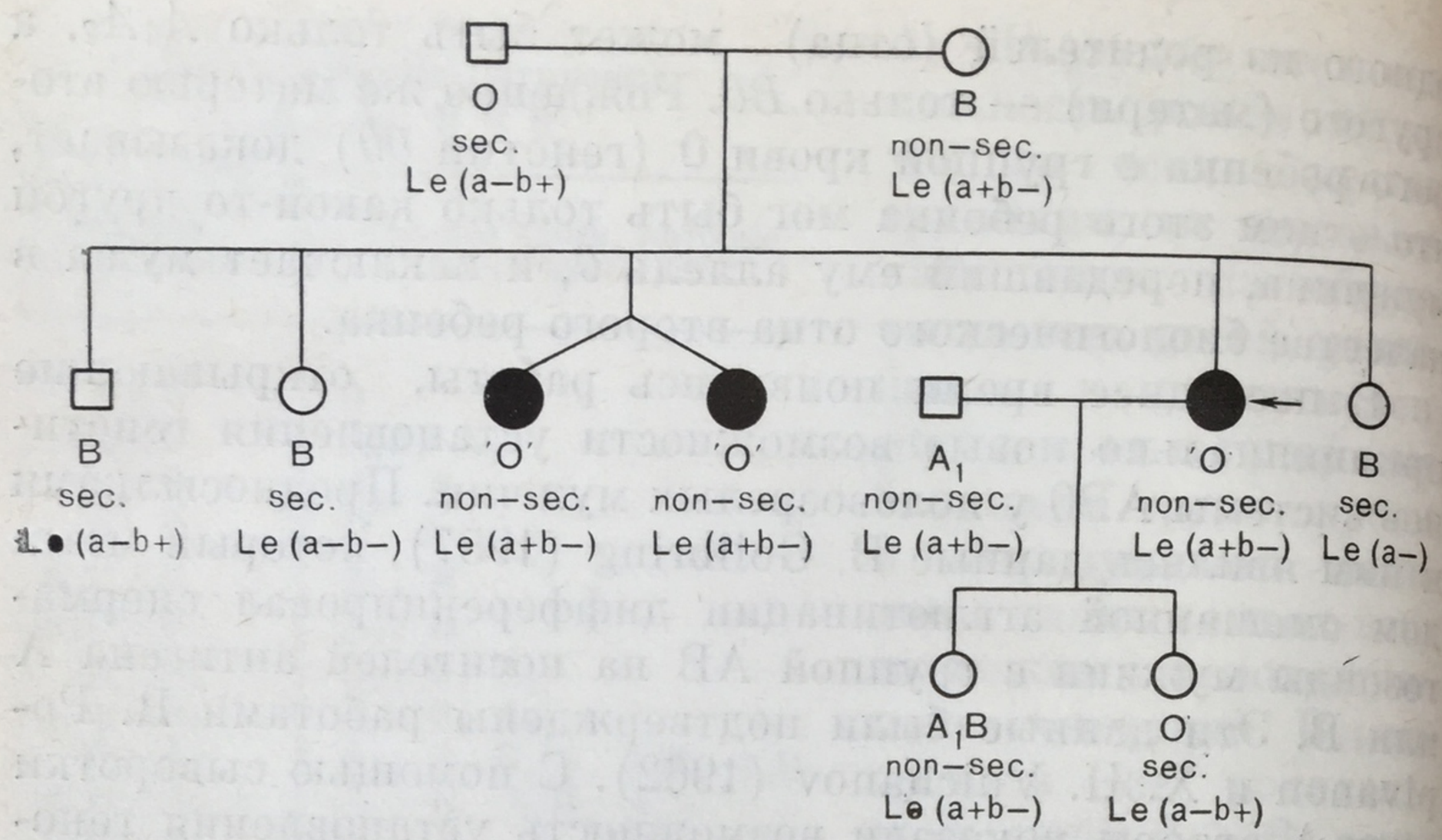


Рис. 1. Родословная семьи с наследственной передачей типа Бомбей. Объяснение см. в тексте.

Согласно современным представлениям, доминантный ген X в гомо- или гетерозиготной форме с рецессивным геном x (X/X или X/x) обусловливает действие структуральных аллелей системы АВ0, при рецессивной же гомозиготии (x/x) действие их угнетается и наблюдается тип Бомбей. Из рис. 1 также видно, что локус генов Xx не связан с генным локусом системы АВ0, поскольку родители лица с этим генетическим феноменом, являясь гетерозиготами X/x, имеют разные группы 0 и В. Если бы генные локусы Xx и *АВ0* были бы сцеплены, то рецессивный супрессор x был бы сцеплен с каким-то определенным аллелем системы АВ0, на самом же деле ген x имеется у лиц с различными группами системы АВ0. Гомозиготное состояние рецессивного гена x является важным моментом и с судебно-медицинской точки зрения, поскольку угнетенный «немой» структуральный аллель, передаваясь по наследству, в новом поколении может реализовать соответствующий антиген системы АВ0. W. Morgan, W. Watkins (1959) предложили схему генетического пути, при котором под влиянием генов *АВ0* и регуляторных генов *Hh* происходит образование антигенов АВН (рис. 2). Согласно этой схеме, образование антигенов АВН начинается с вещества-предшественника. Под влиянием гена *H* оно превращается в субстанцию Н, которая в свою очередь при наличии аллеля *A* или *B* превращается в соответствующий антиген. Ген *0* является аморфом, не вызывающим

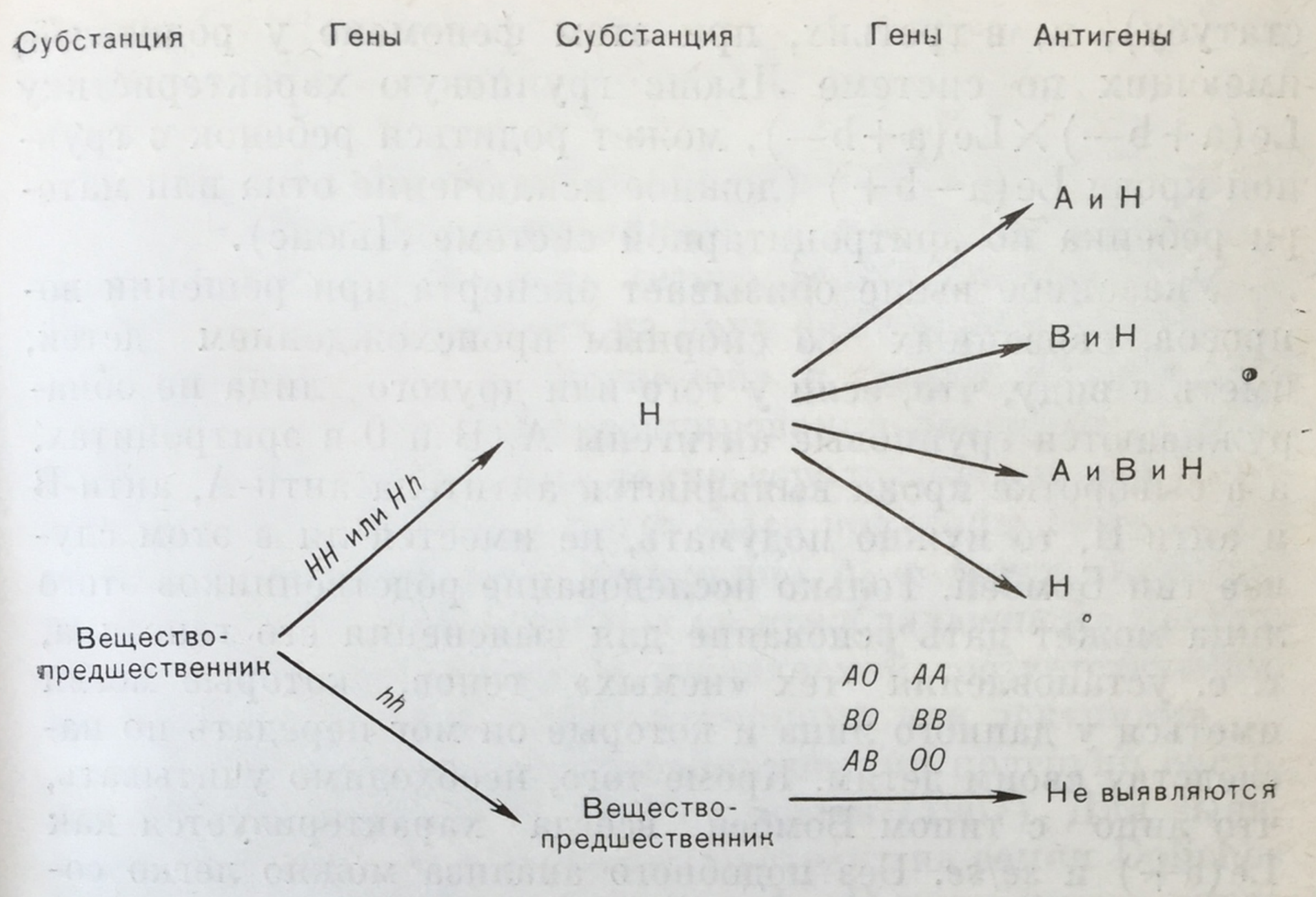


Рис. 2. Схема генетической реализации антигенов системы АВ0(Н).
Объяснение см. в тексте.

превращений. Регуляторный ген h в гомозиготной форме (h/h) также не формирует субстанции Н и образуется тип Бомбей.

Исключительная редкость феномена типа Бомбей свидетельствует также о большой редкости тормозного рецессивного регуляторного гена h в системе Hh и особенно его генотипически гомозиготной супрессорной формы hh. Несмотря на это, данный феномен обязательно должен учитываться судебно-медицинскими экспертами при использовании антигенов системы АВ0 в делах о спорном происхождении детей. Игнорирование его может привести к ошибочным выводам. В подобных случаях может возникнуть ошибка: во-первых, лицо с типом Бомбей может передать по наследству «немой» ген из-за своего гомозиготного супрессорного состояния и у потомка могут иметься групповые антигены системы АВ0, якобы отсутствующие и у отца и матери (т. е. ложное исключение отца или матери ребенка по системе АВ0); во-вторых, при наличии этого генетического феномена у двух родителей, являющихся якобы невыделителями и имеющими генотип $se/se \times se/se$, может родиться ребенок — выделитель групповых субстанций АВ0, т. е. имеющий ген Se (ложное исключение отца или матери ребенка по секреторному

статусу), и, в-третьих, при этом феномене у родителей, имеющих по системе Льюис групповую характеристику Le(a+b—)×Le(a+b—), может родиться ребенок с группой крови Le(a—b+) (ложное исключение отца или матери ребенка по эритроцитарной системе Льюис).

Указанное выше обязывает эксперта при решении вопросов, связанных со спорным происхождением детей, иметь в виду, что, если у того или другого лица не обнаруживаются групповые антигены А, В и 0 в эритроцитах, а в сыворотке крови выявляются антитела анти-А, анти-В и анти-Н, то нужно подумать, не имеется ли в этом случае тип Бомбей. Только исследование родственников этого лица может дать основание для выяснения его генотипа, т. е. установления тех «немых» генов, которые могли иметься у данного лица и которые он мог передать по наследству своим детям. Кроме того, необходимо учитывать, что лицо с типом Бомбей всегда характеризуется как Le(a+) и *se/se*. Без подобного анализа можно легко совершить ошибку и произвести исключение там, где оно не должно быть.

Еще один генетический феномен под названием «ген *AB*» описали H. Seyfried и соавт. (1964). Авторы наблюдали рождение двух детей A_2B у родителей $A_2B \times 0$. Поскольку возможность рождения детей не от этих супругов полностью исключалась, оставалось констатировать весьма необычный генотип $A^2B/0$ у этих детей. Появление атипичного аллеля, названного «цис-*AB*», объясняют хромосомными аберрациями, причем при обоюдной транслокации у носителя «цис-*AB*» один из антигенов (либо А, либо В) выражен значительно слабее по сравнению с обычными антигенами А или В.

Для дифференцирования обычной группы АВ от формы «цис-АВ» необходимо учитывать, что в этой форме антиген А при исследовании образцов крови протектином анти-А из белка улитки Helix pomatia имеет нормальную силу выраженности. Сила же выраженности антигена В чаще всего снижена, а содержание субстанции Н значительно выше, чем при обычной группе АВ. И, наконец, в сыворотке лиц-носителей формы «цис-АВ» всегда имеется антитело анти-В.

Этот феномен, так же как и феномен типа Бомбей, представляет, по-видимому, исключительную редкость.

Методы определения фенотипов системы АВ0. Методики определения четырех основных групп системы АВ0

в жидкой крови хорошо известны, поэтому мы остановимся лишь на методах определения подгруппы A_1 и A_2 (A_1B и A_2B).

Напомним, что большинство группоспецифичных антител, включая изоагглютинины α и β, не однородны, а представляют собой смесь гетерогенных антител. Например агглютинин α состоит из двух фракций: α_1 (анти-A_1), реагирующей с A_1, и «истинной» α, взаимодействующей с A_1, A_2 и др. Для дифференцирования подгрупп A_1 и A_2 (A_1B и A_2B) необходимы такие серологические реагенты, которые лишь частично могут быть получены из сыворотки крови человека (α_1). Подгруппа A_2 и другие подгруппы А могут быть обнаружены по преобладающему присутствию в них субстанции Н, выявляемой соответствующими растительными фитоагглютининами или лектинами.

В СССР методика дифференцирования подгрупп системы АВ0 разработана М. И. Потаповым (1967). Для выявления антигена A_1 используют экстракт из семян Dolichos biflorus, который не реагирует с A_2. В эритроцитах группы A_1 антигена HA_1 мало или он содержится в следовых количествах, в эритроцитах A_2 содержится значительное количество антигена Н. Поэтому для дифференцирования подгрупп и применяют лектины анти-Н (экстракты из семян Laburnum Watereri, Cytisus cessifolius, Lotus tetragonolubus, Phosoleus lunatus).

С помощью метода тройного определения подгрупп экстрактами анти-A_1, анти-А и анти-Н, предложенного М. И. Потаповым, можно провести двойную оценку выраженности антигена А экстрактами анти-A_1 и анти-А, учитывая присутствие антигена Н, что практически исключает экспертную ошибку. Результаты такого исследования подгрупп A_2 и A_2B представлены в табл. 3. Из данных табл. 3 видно, каким образом судебно-медицинский эксперт может дифференцировать подгруппы А и АВ с помощью набора фитоагглютининов различной серологической направленности.

Частота распространения групп системы АВ0. Вероятность исключения отцовства при использовании той или иной изосерологической, сывороточной или ферментной системы крови будет зависеть от степени ее полиморфности. Последняя обусловлена числом и частотой распределения аллелей, контролирующих полиморфизм системы среди той или иной популяции. Система АВ0 в этом отношении является весьма полиморфной, поскольку она

Таблица 3

Варианты результатов реакции по определению подгрупп A_2 и A_2B тройным методом

(по Потапову М. И., 1967)

Группа А				Группа АВ			
экстракт и его титр			подгруппа	экстракт и его титр			подгруппа
анти-A_1 1 : 32	анти-А 1 : 256	анти-Н 1 : 32		анти-A_1 1 : 128	анти-А 1 : 512	анти-Н 1 : 128	
++++	++++	—	A_1	++++	++++	—	A_1B
++++	++++	++	A_1	++++	++++	+	A_1B
—	+++	+++	A_2	—	+++	+++	A_2B
—	++	+++	A_2	—	++	±	A_2B
∓	+++	++	A_2	—	++	—	A_2B
++	+++	++++	A_2	∓	+++	+	A_2B

Обозначения:

++++ максимально выраженная агглютинация («розовый» лепесток);

+++ агглютинация, наблюдаемая невооруженным глазом, в виде нескольких конгломератов;

++, +, ±, ∓ агглютинация, определяемая микроскопически.

контролируется четырьмя аллельными генами A^1, A^2, B и 0, фенотипически подразделяющими всех людей на шесть групп 0, A_1, A_2, B, A_1B и A_2B с различной частотой встречаемости среди различных народов и рас.

Вероятность исключения отцовства при применении любой двуаллельной генетически обусловленной системы крови можно рассчитать по формуле:

$$P = \frac{B}{2} \times \left(1 - \frac{B}{2}\right),$$

где P — вероятность исключения, а B — частота встречаемости гетерозиготных групп для системы двойных аллельных генов в процентах. Отсюда вытекает, что различные системы групп крови, а также разные антигены представляют различную ценность для экспертиз спорного отцовства в зависимости от того, как часто они встречаются у населения.

Частота вероятности исключения отцовства при применении генетических систем крови, контролируемых более чем двумя аллелями, высчитывается по более сложным

формулам. При этом следует отметить, что чем большее число аллелей контролирует полиморфизм какой-либо системы крови, тем выше вероятность исключения отцовства при ее экспертном применении. По данным ряда авторов, вероятность исключения отцовства при использовании только одной системы АВ0 даже без учета ее подгрупп А достаточно высока и в среднем для всех трех основных рас (европеоидной, негроидной и монголоидной) составляет около 17,6%. Наибольшая вероятность исключения отцовства по системе АВ0 отмечается среди монголоидных популяций, причем средняя вероятность достигает здесь 19,17%, среди негроидных популяций она составляет 17,74%, а среди европеоидных народов — 13,42%.

Итак, генетически детерминированная четырехаллельная система АВ0 с ее шестью основными фенотипами играет большую роль при проведении судебно-медицинских экспертиз, связанных со спорным происхождением детей. Полная онтогенетическая сформированность групповых антигенов системы АВ0 во внутриутробном периоде позволяет использовать эту систему в экспертизах, проводимых при ранних сроках жизни ребенка, что имеет практическое значение. Четкий порядок наследования антигенов системы АВ0 и крайняя редкость ее «необычных» фенотипов также способствуют широкому использованию этой системы в экспертизах спорного отцовства, материнства и замены детей.

Глава 2
СИСТЕМА MNSs

В систему MNSs выходят антигены M, N, S, s и ряд других редких антигенов (M_2, M_3, M^c, M^g, M^k, M^z, M^r, Hu, He, N_2, N^a, S^u и др.). Открытая в 1927 г. K. Landsteiner и R. Levine система MN более 20 лет представлялась простой двуаллельной генетической системой с двумя гомозиготными фенотипами M и N и одним гетерозиготным MN, причем четкий аутосомальный кодоминантный порядок наследования ее антигенов был подтвержден многочисленными семейными обследованиями. У человека антигены системы MNSs полностью сформированы к моменту его рождения.

R. Walsh и C. Montgomery (1947) в сыворотке крови беременной женщины выявили антитело ранее неизвестной специфичности, названное ими анти-S. R. Sanger и

соавт. (1947) смогли использовать его для подразделения групп крови системы MN. Авторы обнаружили, что антиген S, выявляемый этим антителом, гораздо чаще встречается вместе с антигеном M, чем с N. Исследователи доказали статистически достоверную связь антигена S с системой MN и отсутствие связи этого антигена с другими группами крови.

Следующим шагом в изучении системы MNS было определение зиготности носителей S. Эта возможность возникла благодаря открытию P. Levine и соавт. (1951) антитела анти-s, выявляющего соответствующий антиген s. В настоящее время в отношении взаимодействия антигенов M, N, S и s выдвинуты две основные гипотезы: гипотеза A. Wiener о существовании единого генного локуса этой системы с четырьмя аллелями *MS*, *Ms*, *NS* и *Ns* и гипотеза R. Race о существовании двух тесно сцепленных генных локусов с аллелями *M* и *N* в локусе *MN* и аллелями *S* и *s* в генном локусе *Ss*. Согласно этим гипотезам, аллели *M*, *N* и *S* по отношению друг к другу являются кодоминантными, а аллель *S* доминирует над рецессивным аллелем *s*. Некоторые сыворотки анти-*S*, «улавливающие» эффект дозы, гораздо сильнее реагируют с гомозиготными эритроцитами *SS*, чем с гетерозиготными *Ss*.

Из всех редких атипичных генетических маркеров системы MNSs наибольший интерес для судебных медиков представляет антиген M^g, открытый E. H. Allen и соавт. (1958). Антиген M^g не выявляется сыворотками анти-M и анти-N, но реагирует с антителами анти-M^g, присутствующими в сыворотках некоторых людей. Поскольку рецептор M^g «ускользает» при исследовании с помощью обычных сывороток анти-M и анти-N, не исключена возможность ошибочного трактования гомозиготности *M/M* или *N/N* при гетерозиготности M/M^g или N/M^g. Многие авторы считают, что частые случаи необъяснимой противоположной гомозиготности у матери и ребенка могут быть обусловлены наличием скрытого рецептора M^g. M. Metaxas (1964) описал гомозиготного субъекта M^g/M^g, эритроциты крови которого, в отличие от ожидаемого, слабо реагировали с большинством сывороток анти-N. Эти данные противоречат первоначальному наблюдению E. H. Allen и соавт. (1958), свидетельствующему о полной негативности M^g к сывороткам анти-M и анти-N.

Следовательно, при экспертизе необходимо учитывать возможность наличия антигена M^g. В табл. 4 приведены

возможности исключения отцовства с учетом и без учета антигена M^g.

Таблица 4

Возможность исключения рождения ребенка от определенных родителей по системе MN с учетом антигена M^g и без него

Мать	Отец	Рождение ребенка исключено	Нет исключения, если:
M	M	N или MN	При учете антигена M^g исключение сохраняется
N	N	M и MN	То же
M	N	M и N	Отец NM^g, а ребенок MM^g или мать MM^g, а ребенок NM^g
N	M	M и N	Отец NM^g, а ребенок MM^g или мать NM^g, а ребенок NM^g
MN	N	M	Отец NM^g, а ребенок MM^g
MN	M	N	Отец MM^g, а ребенок NM^g
N	MN	M	Мать NM^g, а ребенок MM^g
M	MN	N	Мать NN^g, а ребенок NM^g
MN	MN	Исключений нет	

Нужно отметить, что число антигенов, относящихся к системе MNSs, постоянно возрастает. К ним относятся открытые в последнее время антигены Mi^a, Vw, Mur, Vr, St^a, Ri^a, Cl^a, Ny^a, Tm, Hil, Si, Z, Far и др. Будут ли они играть впоследствии какую-нибудь роль для практики, в том числе и для судебно-медицинской, покажет будущее.

Судебно-медицинской значение системы MNSs. Для судебно-медицинской экспертизы спорного отцовства, материнства и замены детей исключительно полиморфная система MNSs играет одну из ведущих ролей.

Четкий порядок наследования антигенов системы MNSs, проверенный на огромном материале семейных обследований, благоприятная частота встречаемости групповых антигенов среди различных популяций, обусловливающая ее исключительно высокую информативность, крайняя редкость атипичных аллелей, «искажающих» обычный порядок наследования основных антигенов этой системы, и, наконец, доступность серологических реагентов, открывающих антигены M и N, а в последнее время S и s, делают незаменимым использование этой системы в судебно-медицинских экспертизах в делах, связанных со спорным происхождением ребенка.

Частота встречаемости аллелей MS, Ms, NS и Ns, контролирующих появление девяти фенотипов системы MNSs

среди различных рас и народов, обусловливает очень высокую степень вероятности исключения отцовства при использовании даже одной этой системы. Вероятность исключения отцовства по системе MNSs для негроидных, европеоидных и монголоидных народов в среднем составляет соответственно 32,06, 30,95 и 25,31%, что значительно превышает вероятность исключения по другим системам крови, за исключением системы HLA.

При использовании четырех сывороток можно установить девять фенотипов этой системы, восемь из которых соответствуют единственно возможному генотипу, и лишь в одном фенотипе генотип определяемого лица может быть двух видов (табл. 5).

Таблица 5

Частота фенотипов (генотипов) системы MNSs
(по Prokop O., Göhler W., 1976)

Реакция с сыворотками				Фенотип (генотип)	Частота, %
анти-M	анти-N	анти-S	анти-s		
+	—	+	—	MS(*MS/MS*)	6
+	—	+	+	MSs(*MS/Ms*)	14
+	—	—	+	Ms(*Ms/Ms*)	8
+	+	+	—	MNS(*MS/NS*)	4
+	+	—	+	MNs(*Ms/Ns*)	22
—	+	+	—	NS(*NS/NS*)	1
—	+	+	+	NSs(*NS/Ns*)	6
—	+	—	+	Ns(*Ns/Ns*)	15
+	+	+	+	MNSs(*MS/Ns*) или (*Ms/NS*)	24

Поскольку для решения вопроса о возможности или невозможности рождения ребенка от определенной родительской пары эксперту необходимо знать генотип того или иного признака у ребенка, его матери и предполагаемого отца (ответчика), то становится ясным преимущество этой изосерологической системы, позволяющей почти во всех случаях устанавливать точный генотип у определенного лица. Даже в случае, в котором непосредственно установить генотип нельзя (при фенотипе MNSs), исследование групповой принадлежности родителей может способствовать определению генотипической характеристики того или иного лица и в зависимости от этого позволяет решать вопрос о происхождении ребенка. Поясним это на конкретном примере.

Ответчик имеет фенотип MNSs, мать и ребенок — фенотип Ms. В данном случае генотип ответчика может быть либо *MS/Ns*, либо *Ms/NS*, а генотип матери и ее ребенка — только *Ms/Ms*. Таким образом, отцом данного ребенка мог быть мужчина, имеющий в своем генотипе Ms (генотип *Ms/NS*), и не может быть мужчина с генотипом *MS/Ns*. Для выяснения истинного генотипа ответчика были определены группы крови системы MNSs его родителей. Оказалось, что мать ответчика имеет группу Ns (генотип *Ns/Ns*). Она могла передать своему ребенку только Ns, следовательно, истинный генотип ответчика в данном случае *MS/Ns*, и он не может быть отцом ребенка с генотипом *Ms/Ms*. Пример наглядно иллюстрирует целесообразность исследования крови родителей для установления генотипа того или иного лица, проходящего по делу о спорном происхождении ребенка.

Техника определения антигенов M и N системы MNSs достаточно хорошо известна, поэтому мы коротко остановимся лишь на методике выявления групповых антигенов S и s.

Выявление антигенов S и s проводят соответствующими антисыворотками, причем антиген S обнаруживается с помощью сывороток анти-S с полными или неполными антителами, а антиген s — только сыворотками анти-s с неполными антителами. Имея сыворотку анти-S, «улавливающую» эффект дозы, эксперт по выраженности агглютинации тест-эритроцитов может устанавливать зиготность антигена S, что необходимо для определения генотипа исследуемого лица. В этом случае в реакцию обязательно должны вводиться эритроциты SS и Ss, служащие контролем. Выявление антигенов S и s соответствующими сыворотками с неполными антителами проводят в непрямой пробе Кумбса с использованием антиглобулиновой сыворотки (АГС).

Некоторые авторы отмечали единичные случаи противоположной гомозиготии матери и ребенка по антигенам S и s, хотя возможность перепутывания детей исключалась. Объяснением этому могут служить крайне редкие слабые варианты S и s, а также присутствие антигена S^u, выявляющегося далеко не всеми сыворотками анти-S. В таких случаях для выяснения истинного генотипа (*S/S* или S/S^u) используют специальную технику, основанную также на «улавливании» эффекта дозы некоторыми изоиммунными сыворотками анти-S с неполными анти-

телами. Во всех случаях, когда у эксперта возникает предположение о возможном действии каких-либо редких атипичных аллелей системы MNSs, необходимо исследовать кровь проходящих по делу лиц различными сериями сывороток анти-M, анти-N, анти-S и анти-s и, если это возможно, провести исследование крови их ближайших родственников. Последнее помогает определить природу того или иного генетического феномена и способствовать правильному экспертному заключению.

При подозрении на наличие антигена M^g исследование родителей ответчика или матери ребенка также обязательно, но при этом надо помнить, что антиген M^g открывается специальными сыворотками анти-M^g, которые не так уж редки. По данным П. Н. Косякова (1965), антитела такой специфичности встречаются примерно в 3% нормальных сывороток и наследуются только вместе с антигеном s.

А. К. Туманов и В. В. Томилин (1969) полагают, что до получения данных о частоте встречаемости фактора M^g в СССР в случаях исключения, например, отцовства по антигенам M или N надо признать целесообразным обязательное исследование других систем крови. Если при таком исследовании исключение будет получено по какой-то еще иной системе, то эксперт вправе категорически исключить отцовство. Если же при исследовании многих других систем исключения не будет, то эксперт должен, давая заключение, оговориться, что полученное им исключение в большинстве случаев бывает правильным и не вызывает сомнения. Но не имея возможности исследовать фактор M^g (который в данном случае может иметь важное значение), эксперт лишен возможности в категорической форме исключить отцовство. Такие данные, по нашему мнению, необходимы суду для вынесения объективного приговора.

Глава 3
СИСТЕМА P

Система P была открыта K. Landsteiner и P. Levine (1927) одновременно с системой MN. Иммунное антитело неизвестной ранее специфичности, полученное авторами, открывало в эритроцитах крови 75—80% людей новый фактор, названный антигеном P, т. е. подразделяло всех людей на группы P^+ и P^- независимо от групп AB0 и

MN. Позднее антитела анти-Р были найдены в нормальных сыворотках крови животных и человека. В СССР иммунные сыворотки анти-Р, пригодные для экспертной практики, получены М. В. Мишаковой (1962).

Семейные обследования свидетельствовали о генетической обусловленности фактора Р, причем они убедительно показывали доминирование Р над р. Особенностью системы Р является значительное различие в выраженности антигена Р в эритроцитах людей, проявляющееся в их различной агглютинабельной и абсорбционной способности. Это создает трудности в диагностике фенотипов системы и повышает требования к сывороткам, выявляющим фактор Р. Хотя фактор Р был выявлен у эмбрионов, некоторые авторы отмечали недостаточную выраженность антигена Р у новорожденных. Многие исследователи подразделяют антиген Р на сильный, средний и слабый, считая, что большинство сывороток анти-Р «улавливают» эффект дозы в эритроцитах РР и Рр.

До 1955 г. система Р представлялась простой однофакторной системой, однако позднее были открыты ее новые антигены. P. Levine и соавт. (1955) нашли в сыворотке больной раком желудка женщины по имени Джей (Jay), имеющей 0, P^- группу крови, необычное антитело, реагирующее с 3000 произвольно выбранными образцами крови. Авторы предположили, что оно взаимодействует с исключительно распространенным антигеном, названным Tj^a (tumor Jay), а само антитело было обозначено анти-Tj^a. Попытки получения его иммунным путем не увенчались успехом. Авторы также предполагают, что существует и другой гипотетический аллель Tj^b, ответственный за появление соответствующего антигена Tj^b. Поскольку антитело анти-Tj^a, найденное у больной, не агглютинировало эритроциты ее родной сестры, был сделан вывод о том, что обе женщины являются гомозиготами по чрезвычайно редкому аллелю Tj^b.

Принадлежность антигена Tj^a к системе Р впервые доказал R. Sanger (1955), который заметил, что все лица, имевшие анти-Tj^a, являются P^-. Автор абсорбировал анти-Tj^a эритроцитами крови людей P^-Tj^a и получил сыворотку анти-Р. Так было доказано, что антитела анти-Tj^a проявляют как бы «расширенную» специфичность к антигену Р, т. е. связывают больше субстанции Р, поскольку реагируют с эритроцитами как P^+-, так и P^--людей. Таким образом, стало понятным, что только у очень немно-

гих людей, считавшихся P^-, совсем не содержится антиген P. Это относится лишь к людям типа Tj^bTj^b, которые генотипически были обозначены рецессивным генотипом pp; в эритроцитах основной массы P^--людей содержится субстанция P, обозначенная P_2. В соответствии с этим антиген P у P^+-людей был назван P_1.

Так возникла трехаллельная теория наследования антигенов системы P, согласно которой в одном аутосомальном генном локусе имеются три аллеля P^1, P^2 и p, причем аллель P^1 доминирует над P^2 и p, а аллель P^2 доминирует над абсолютно рецессивным аллелем p. Таким образом, «старая» группа P^+ получила новое название — фенотип P_1 (генотипы P^1/P^1, P^1/P^2, P^1/p), а внутри «старой» группы P^- появились две новые: фенотип P_2 (генотипы P^2/P^2 и P^2/p) и фенотип p, или «истинно» P-отрицательная группа с единственно возможным генотипом p/p. Стало ясно, что ранее известные сыворотки анти-P являлись сыворотками анти-P_1, реагировавшими с эритроцитами P_1P_1, P_1P_2, P_1p, причем агглютинабельная способность последних определялась их генотипическим набором из-за «улавливания» многими сыворотками анти-P_1 эффекта дозы. Сыворотка анти-Tj^a являлась же сывороткой анти-P_1+P_2 и реагировала как с P^+-эритроцитами P_1P_1, P_1P_2, P_1p, так и с большей частью P^--эритроцитов P_2P_2 и P_2p. Этим и объясняется необычная на первый взгляд универсальность этого антитела, не взаимодействующего лишь с эритроцитами pp(Tj^bTj^b).

По нашему мнению, безусловный интерес представляет попытка иммунизации животных эритроцитами людей типа Tj^bTj^b с последующим абсорбированием антител эритроцитами P_1P_2 для получения сыворотки анти-p.

В последние годы представления о системе P еще более усложнились в связи с открытием G. A. Matson и соавт. (1959) нового антигена P^b. Современная теория признает наличие в генном локусе системы P четырех аллелей P^1, P^2, P^k и p. При этом аллель P^1 является абсолютно доминантным, аллель p — абсолютно рецессивным, а аллель P^2 доминирует над аллелем P^k. Согласно этой теории, в системе P имеются четыре группы: P^1 (генотипы P^1/P^1, P^1/P^2, P^1/P^k, P^1/p), P_2 (генотипы P^2/P^2, P^2/P^k, P^2/p), P^k (генотипы P^k/P^k, P^k/p) и p (генотип p/p). Все это свидетельствует о том, что возможности изосерологической системы P для судебно-медицинской практики вообще и для экспертизы спорного отцовства в частности являются да-

леко не исчерпанными. Если в настоящее время мы довольно-таки грубо подразделяем всех людей только на две группы P^+ и P^-, то в недалеком будущем при наличии соответствующих сывороток анти-P_1, анти-P_2, анти-P^k и анти-p мы сможем с уверенностью говорить уже о десяти (!) группах этой системы.

Однако и грубое подразделение всех людей на две группы P^+ и P^- все же позволяет использовать систему P в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства. Частота встречаемости фенотипа P^+ среди европеоидных, монголоидных и негроидных популяций в среднем составляет соответственно 75, 65 и 80%. В непосредственной зависимости от частоты встречаемости антигена P_1 среди населения той или иной страны находится и процентная вероятность исключения отцовства по группам системы P. Так, очень высокая частота встречаемости антигена P_1 среди негритянского населения резко снижает вероятность исключения отцовства по данной системе. По данным R. Chakraborty и соавт. (1974), этот показатель в негроидных популяциях составляет всего 0,26%, в то время как среди европеоидов он намного выше — 2,66%. Наибольший же процент вероятного исключения отцовства по системе P приходится на монголоидные популяции — в среднем 8,09%.

В Советском Союзе в судебно-медицинской экспертной практике для выявления антигена P_1 используют иммунные сыворотки анти-P, полученные путем иммунизации кроликов человеческими эритроцитами группы P^+. Поскольку такие сыворотки не всегда открывают слабое свойство P (по-видимому, в генотипах P^1/P^2 и P^1/p), при проведении экспертиз спорного происхождения детей кровь всех проходящих по делу лиц исследуют не одной, а несколькими сериями сывороток анти-P (не менее трех), что исключает возможность ошибочного заключения. При этом обязательным условием является введение в реакцию заведомо известных контрольных стандартных эритроцитов P^+ с различной силой выраженности антигена P.

Глава 4

СИСТЕМА РЕЗУС

Принятая в настоящее время в Европе номенклатура генов, антигенов, генотипов и фенотипов системы резус Fisher — Race с буквенным и пространственным изобра-

жением более наглядна и доступна для понимания, чем номенклатура Wiener, в которой главную роль играют различного рода символы, обозначающие гены и антигены этой системы. Так, по номенклатуре Fisher — Race генотип *CDe/cDE* легко воспроизводим в речевом и зрительном аспекте. Во-первых, он показывает, что эритроциты данного человека имеют пять антигенов или пять резус-факторов C, c, D, E, e. Во-вторых, видно, что на одной хромосоме в генном локусе резус имеются три гена *C*, *D* и *e*, а на гомологичной хромосоме в подобном генном локусе — гены *c*, *D* и *E*. В-третьих, этот генотип легко читается. По номенклатуре Wiener этот же генотип обозначается как R^1R^2. Практически его не всегда можно точно установить, поскольку, если по номенклатуре Wiener эритроциты характеризуются наличием факторов rh'_+, hr'_+, Rh_{o+}, hr''_+, rh''_+, а по номенклатуре Fisher — Race C^+, c^+, D^+, E^+, e^+, то эти эритроциты имеют фенотип Rh_1Rh_2 (по Wiener) или CcDEe (по Fisher — Race). Поскольку «аллельный» ген к фактору D не обнаруживается и групповые факторы C, c и E, e могут иметь различные аллельные комбинации в обоих генных локусах, то для этого фенотипа системы резус возможны шесть генотипических комбинаций (приведены в соответствии с частотой их встречаемости).

По Wiener	*По Fisher—Race*
R^1/R^2	*CDe/cDE*
R^1/r''	*CDe/cdE*
R^2/r'	*Cde/cDE*
R^z/r	*CDE/cde*
R^z/R^o	*CDE/cDe*
R^o/r^y	*cDe/CdE*

Номенклатура семи важнейших антигенов (резус-факторов) и двенадцати генов (генных комбинаций) системы резус (по Wiener и Fisher — Race) выглядит следующим образом:

Антигены по Wiener: — rh', rh^w, hr', Rh_0, Hr_0, rh'', hr''.
Резус-факторы по Fisher—Race: C, C^w, c, D, d, E, e.
Гены по Wiener: r, r', r'', r^y, R', R'', R^o, R^z, r^{ww}, r^{yw}, R'^w, R^{zw}.
Генные комбинации по Fisher—Race: *cde, Cde, cdE, CdE, CDe, cDE, cDe, CDE*, C^wde, C^wdE, C^wDe, C^wDE.

Из комбинации двух любых генов (по Wiener) или любых двух генных комбинаций (по Fisher — Race) могут быть образованы 36 различных генотипов системы резус

(если не принимать во внимание фактор C^w) и 78 генотипов с учетом фактора C^w.

При использовании Rh — Hr-номенклатуры Wiener для обозначения гено- и фенотипов системы резус (Rh) необходимо учитывать следующее: а) для генов, генотипов и фенотипов с наличием фактора Rh_o(D) дается обозначение R, при отсутствии фактора Rh_o (D) — обозначение r; б) гены и генотипы печатаются курсивом (так же и по CDE-номенклатуре), а дополнительные обозначения — вверху как показатель степени (например, R^1r); в) фенотипы печатаются прямым шрифтом, а дополнительные обозначения (кроме штрихов) — внизу (например, R_1r).

Сыворотки анти-Rh. Современный взгляд на природу неполных антител. Многочисленные антигены, или факторы, Rh-системы были открыты благодаря обнаружению соответствующих Rh-антител.

В настоящее время в экспертной практике применяются лишь анти-Rh сыворотки изоиммунного характера.

Причины образования Rh-антител весьма разнообразны: 1) спонтанно образованные антитела анти-Rh; 2) переливание Rh-несовместимой крови; 3) Rh-несовместимость при беременности; 4) искусственная иммунизация добровольных доноров. Антигенное воздействие разнообразных факторов Rh-системы чрезвычайно различно. Так, если получение изоиммунных антител анти-Rh_o (анти-D) относительно простое, то получение изоиммунных сывороток анти-hr'' (анти-е) является весьма затруднительным.

Rh-антитела очень редко бывают полными (бивалентными, солевыми), т. е. проявляющими свое агглютинирующее свойство в физиологическом растворе, и гораздо чаще — неполными [Hummel K., 1955]. Неполные (блокирующие) антитела анти-Rh имеют низкую молекулярную массу, не агглютинируют соответствующие эритроциты в солевой среде, а лишь блокируют их. Агглютинация блокированных эритроцитов наступает лишь после добавления к ним особых белковых субстанций — супплиментов (бычий альбумин, бычья антисыворотка, раствор желатины, сыворотка крови человека одноименной по системе группы АВ0 или АВ и др.). Другая возможность агглютинации эритроцитов неполными антителами анти-Rh заключается в предварительной обработке эритроцитов ферментами или их растворами (например, фильтратами

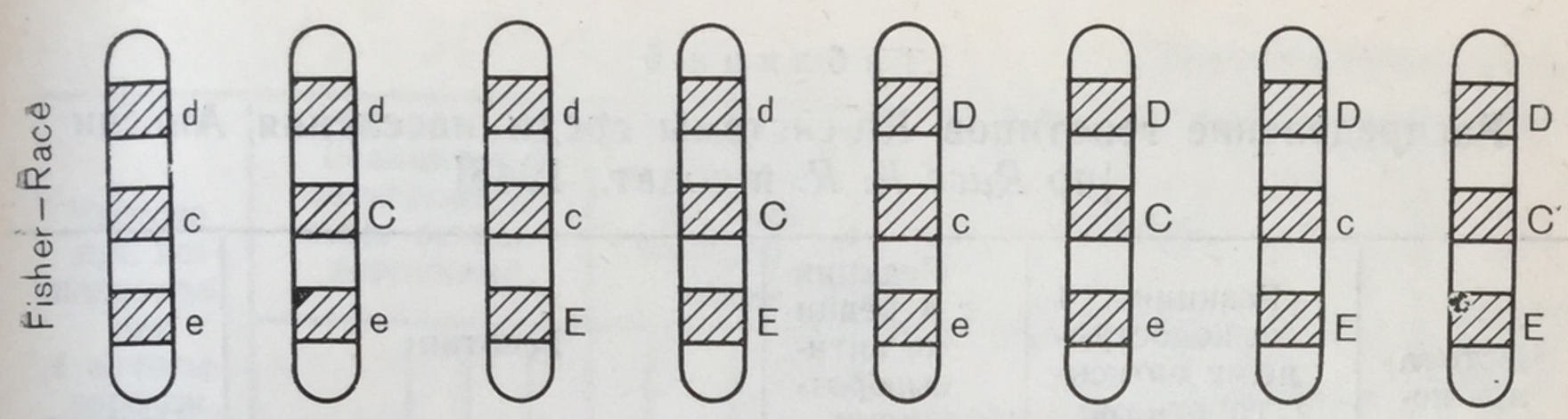
холерного вибриона, трипсином, папаином и бромелином — особыми ферментами ананаса, проназой — протеазой из Streptomyces griseus, протеазой из Aspergillus ochraceus). По данным E. Klenk, G. Uhlenbruck (1957), многие ферменты, способные расщеплять эритроцитарную оболочку и тем самым снижать величину поверхностного заряда, освобождают соответствующие антигенные рецепторы эритроцитов, с которыми могут реагировать неполные антитела даже в солевом растворе.

Еще одной разновидностью неполных антител анти-Rh являются так называемые криптагглютиноиды — неполные, блокирующие антитела, которые не способны агглютинировать эритроциты с соответствующей специфичностью ни в изотоническом растворе NaCl, ни в растворе альбумина (макромолекулярной среде). Их действие можно выявить с помощью высокочувствительной серологической реакции: непрямой антиглобулиновой пробы, или теста, разработанной R. R. A. Coombs, A. E. Mourant, R. R. Race (1946) и известной под названием непрямой пробы Кумбса.

В результате обработки эритроцитов неполными антителами анти-Rh, являющимися криптагглютиноидами, эти эритроциты «обволакиваются» или сенсибилизируются к антиглобулиновой сыворотке человека. Эта сыворотка и агглютинирует сенсибилизированные эритроциты, поскольку она содержит антитела к глобулинам. По мнению некоторых исследователей, в данном случае происходит не чистая агглютинация эритроцитов, а скорее их преципитация.

Для получения гетероиммунной антиглобулиновой сыворотки предложено несколько способов: иммунизация кроликов и коз сывороткой крови человека, иммунизация коз очищенным человеческим иммуноглобулином, иммунизация кроликов суспензией гомогенизированных волос человека. Непрямая проба Кумбса является универсальной реакцией для обнаружения при помощи неполных антител не только антигенов Rh-системы, но и многих антигенов других изосерологических систем крови. Существуют многочисленные модификации этого теста.

Однако при применении этой высокочувствительной серологической реакции как в классическом варианте, так и в различных модификациях исследователь всегда должен помнить о возможности ошибочной интерпретации полученных результатов, связанной с холодовыми антителами, с так называемым феноменом зоны, влиянием различных химических веществ, например солей металлов, и различных лекарственных препаратов [Косяков П. Н., 1965], и исключить такую возможность.



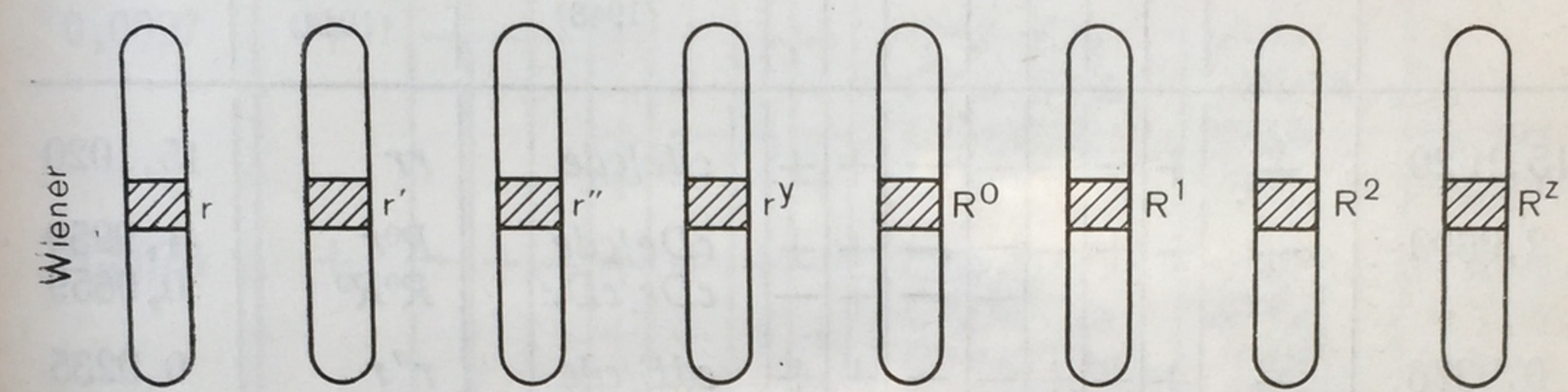


Рис. 3. Схематическое изображение единого генного локуса системы Rh (по A. Wiener) или трех тесно сцепленных локусов этой системы (по R. Fisher, R. Race).

Латинскими буквами обозначены соответствующие аллели (по R. Fisher, R. Race) или единый ген (по A. Wiener).

Генетические концепции наследования Rh-системы. Как уже отмечалось, согласно теории Wiener, различные отдельные факторы, или Rh-антигены, открываемые в эритроцитах, являются продуктом одного какого-то определенного гена. То-есть каждый конкретный ген обусловливает свою, присущую только ему резусную мозаику факторов в эритроцитах. Краеугольным же камнем теории Fisher — Race является положение, согласно которому каждому фактору, или Rh-антигену, открываемому в эритроцитах, соответствует свой конкретный ген. Поскольку проведенные исследования свидетельствуют о том, что все отдельные факторы Rh-системы наследуются неразделимо, все же, по-видимому, следует признать правильность предположений A. S. Wiener о том, что вся резусная мозаичность действительно обусловлена действием отдельных генов.

Огромное число всевозможных мозаичных резусных комбинаций представлено в табл. 6. Такое разнообразие A. S. Wiener объясняет наличием на соответствующих хромосомах в едином генном Rh-локусе множественных аллелей, в то время как R. A. Fisher и R. R. Race допускают наличие по крайней мере трех таких локусов (обо-

Таблица 6

Распределение генотипов Rh-системы среди населения Англии
[*по Race R. R.* и соавт., 1948]

Частота при использовании 4 антисывороток, %	Реакция с 4 легкодоступными антисыворотками				Реакция с 4 редкими антисыворотками				Генотип		Частота групп Rh, %
	$C+C^W$	c	D	E	C	C^W	e	d	номенклатура Fisher—Race (1948)	номенклатура Wiener (1944)	
15,1020	—	+	—	—	—	—	+	+	*cde/cde*	*rr*	15,1020
2,0609	—	+	+	—	—	—	+	+	*cDe/cde*	R^0r	1,9950
					—	—	+	—	*cDe/cDe*	R^0R^0	0,0659
0,9376	—	+	—	+	—	—	+	+	*cdE/cde*	$r''r$	0,9235
					—	—	—	+	*cdE/cdE*	$r''r''$	0,0141
					—	—	—	—	*cDE/cDE*	R^2R^2	1,9906
					—	—	—	+	*cDE/cdE*	R^2r''	0,3353
14,0769	—	+	+	+	—	—	+	—	*cDE/cDe*	R^2R^0	0,7243
					—	—	+	+	*cDE/cde*	R^2r	10,9657
									cDe/cdE	R^0r''	0,0610
0,7644	+	+	—	—	+	—	+	+	*Cde/cde*	$r'r$	0,7644
					—	+	+	+	C^wde/cde	r^wr	0
					+	—	+	—	*CDe/cDe*	R^1R^0	2,0922
					+	—	+	+	*CDe/cde*	R^1r	31,6759
									cDe/Cde	R^0r'	0,0505
34,8899	+	+	+	—	—	+	+	—	C^wDe/cDe	$R^{1w}R^0$	0,0664
					—	+	+	+	C^wDe/cde	$R^{1w}r$	1,0049
									C^wde/cDe	r'^wR^0	0
					+	—	+	+	*cdE/Cde*	$r''r'$	0,0234
									CdE/cde	r^yr	0
0,0234	+	+	—	+	+	—	—	+	*CdE/cdE*	r^yr''	0
					—	+	+	+	C^wde/cde	$r^{1w}r$	0
					+	—	+	—	*CDe/cDE*	R^1R^2	11,5000
									cDe/CDE	R^0R^z	0,0125
13,4178									*CDe/cdE*	R^1r''	0,9685
					+	—	+	+	*cDE/Cde*	R^2r'	0,2775
									CDE/cde	R^zr	0,1893
									CdE/cDe	r^yR^0	0
	+	+	+	+	+	—	—	—	*cDE/CDE*	R^2R^z	0,0687
					+	—	—	+	*cdE/CDE*	$r''R^z$	0,0058
									CdE/cDE	r^yR^2	0
					—	+	+	—	C^wDe/cDE	$R^{1w}R^2$	0,3648
					—	+	+	+	C^wDe/cdE	$R^{1w}r''$	0,0307
									C^wde/cDE	$r^{1w}R^2$	0
					+	—	+	+	*Cde/Cde*	$r'r'$	0,0097

Частота при использовании 4 антисывороток, %	Реакция с 4 легкодоступными антисыворотками				Реакция с 4 редкими антисыворотками				Генотип		Частота групп Rh, %
	$C+C^w$	c	D	E	C	C^w	e	d	номенклатура Fisher—Race (1948)	номенклатура Wiener (1944)	
0,0097	+	—	—	—	+	+	+	+	$C^w de/Cde$	$r^{1w}r'$	0
					—	+	+	+	$C^w de/C^w de$	$r^{1w}r^{1w}$	0
					+	—	+	—	CDe/CDe	R^1R^1	16,6097
					+	—	+	+	CDe/Cde	R^1r'	0,8016
18,5073	+	—	+	—	+	+	+	—	$CDe/C^w De$	R^1R^{1w}	1,0539
					+	+	+	+	$C^w De/Cde$	$R^{1w}r'$	0,0254
									$C^w de/CDe$	$r^{1w}R^1$	0
					—	+	+	—	$C^w De/C^w De$	$R^{1w}R^{1w}$	0,0167
					—	+	+	+	$C^w de/C^w De$	$r^{1w}R^{1w}$	0
					+	—	+	+	CDe/CDE	R^1R^z	0,1985
					+	—	+	+	Cde/CDE	$r'R^z$	0,0048
									CdE/CDe	r^yR^1	0
0,2101	+	—	+	+	+	—	—	—	CDE/CDE	R^zR^z	0,0006
					+	+	+	—	$C^w De/CDE$	$R^{1w}R^z$	0,0062
					+	—	—	+	Cde/CDE	r^yR^z	0
					+	+	+	+	$CdE/C^w De$	r^yR^{1w}	0
									$C^w de/CDE$	$r^{1w}R^z$	0
					+	—	+	+	CdE/Cde	r^yr'	0
0,0000	+	—	—	+	+	—	—	+	CdE/CdE	r^yr^y	0
					+	+	+	+	$CdE/C^w de$	r^yr^{1w}	0

Примечание. Для анти-d реакция предположительная, поскольку до сих пор сывороток анти-d не найдено.

значенных ими локусами C, D и E) на одной хромосоме (рис. 3).

Если предположить, что отдельные Rh-факторы действительно имеют на хромосоме отдельные генные локусы, то рано или поздно должен произойти так называемый перекрест хромосом, или кроссинговер, который должен наблюдаться реально. Это положение является одним из основных в теории R. A. Fisher и R. R. Race, которые полагают, что на хромосоме имеются три исключительно тесно сцепленных генных локуса Rh-системы, а в каждом из них есть пара аллельных генов, ответственных за по-

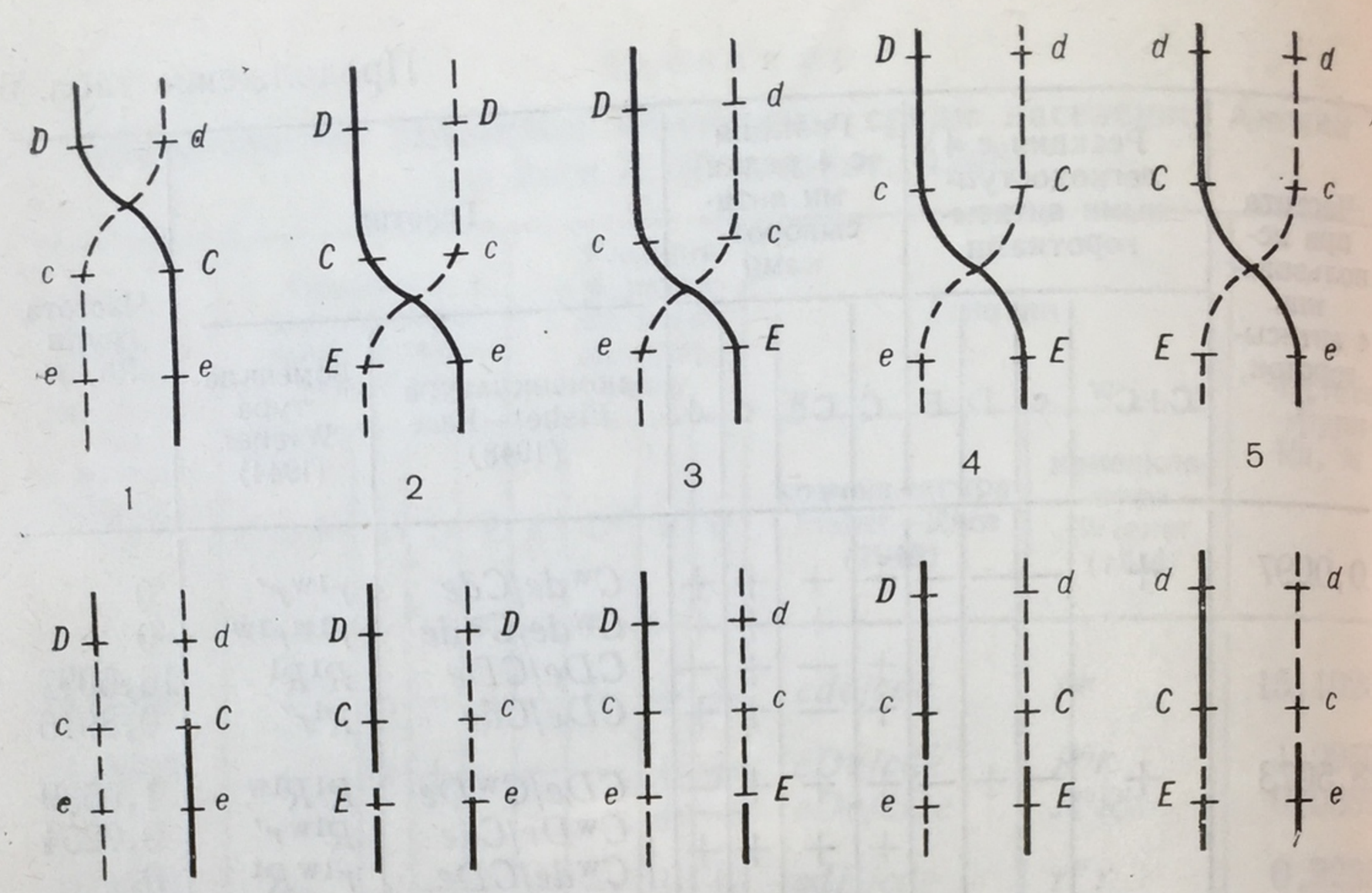


Рис. 4. Случаи перекреста хромосом, несущих генные локусы системы Rh, согласно теории R. Fisher, R. Race.
Объяснение см. в тексте.

явление того или иного Rh-фактора. Теория английских генетиков весьма оригинальна. Они считают, что, если изучить фенотипы Rh-системы в конкретной популяции, то можно найти распространенные, редкие и чрезвычайно редкие фенотипы. Из этого делается вывод о том, что редкие фенотипы Rh-системы обусловлены редкими генными комбинациями на хромосомах, возникающими в результате кроссинговера между двумя гомологичными хромосомами, а исключительно редкие фенотипы — за счет хромосом, которые сами уже явились продуктом перекреста (т. е. хромосомы 1-го, 2-го и 3-го порядков).

В теории Fisher — Race большое внимание уделяется порядку, или последовательности, расположения генных локусов *C*, *D* и *E*. Он определяется наиболее часто встречающимися фенотипическими резусными комбинациями, из которых наиболее распространенными являются комбинации *DCe*, *DcE* и *dce*. Далее, если допустить возможность кроссинговера между *DCe* и *dce*, а также между *DcE* и *dce*, то при этом фенотипически всегда будет наблюдаться *Dce*. Такой же фенотипический продукт *Dce* возникнет и при перекресте хромосом наиболее распространенных резусных комбинаций *DCe* и *DcE* (рис. 4).

A. S. Wiener неоднократно выступал против существования кроссинговера. Главным аргументом A. S. Wiener

являлось то, что до сих пор никто с достоверностью не смог обнаружить перекрест хромосом, на котором построена вся теория R. A. Fisher и R. R. Race. Его английские оппоненты на это, правда, отвечали, что из-за очень тесного сцепления генных локусов Rh-системы на хромосомах случаи генного кроссинговера чрезвычайно редки, поэтому семейный материал, который мог бы демонстрировать эти случаи, чрезвычайно скудный.

Открытие многочисленных новых факторов Rh-системы и их разновидностей подтверждает правильность теории Wiener. Необходимо, правда, отметить, что, несмотря на то что теория «одного» гена Wiener является в настоящее время господствующей, номенклатура Fisher — Race благодаря своей простоте завоевала всеобщее признание во всем мире, что не отрицал и сам A. Wiener.

Особые генетические формы Rh-системы. Прежде чем более подробно остановиться на всех аспектах использования Rh-системы в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей, необходимо коротко упомянуть о так называемых особых генетических формах этой сложной системы, тем более что некоторые из них, по-видимому, могут иметь непосредственное отношение к такого рода экспертизам.

Варианты антигена D (Rh_0). F. Stratton (1946) описал слабый фактор Rh_0 (D), названный им фактором D^u. В дальнейших исследованиях была определена его генетическая природа и показана наследуемость. Антиген D^u не выявляется агглютинирующими сыворотками анти-Rh_0, но может быть обнаружен неполными антителами анти-Rh_0 в непрямой пробе Кумбса.

Кроме фактора Rh_0 со слабой агглютинабельной способностью, были описаны и его разновидности с исключительно высокой агглютинабельностью, обозначенные фактором —D—. Семейные обследования нового фактора —D— также показали его генетическую обусловленность и наследственную передачу. Эритроциты крови людей, имеющих тип —D—, агглютинировались неполными антителами анти-Rh_0 даже в солевой среде изотонического раствора NaCl. В дальнейшем были обнаружены гомозиготы *—D—/—D—*, в эритроцитах которых факторы C и c, а также E и e отсутствовали. По теории Wiener, этот антиген, обозначенный Rh_0, обязан своим появлением особому аллелю R_0.

Антиген (агглютиноген) Rh_0 имеет видоизмененную

химическую структуру, которая резко усиливает его реакцию с антителами анти-Rh_0 и одновременно угнетает воздействие всех других антирезусных сывороток [Wiener A., Wexler I., 1960]. Это тип резуса был также обозначен как супер-Rh_0. Как указывают O. Prokop и W. Göhler (1976), тип супер-Rh_0 представляет большую опасность для судебных медиков при проведении экспертиз в делах о спорном происхождении детей. Частота встречаемости этого антигена еще недостаточно изучена, поэтому сейчас трудно сказать, насколько он опасен для экспертизы. Судебные медики, если не будут учитывать силу выраженности антигена —D—, могут ошибочно диагностировать, например, гетерозиготу *—D—/CDe* как гомозиготу *CDe/CDe*, поскольку в данном случае будет отсутствовать агглютинация эритроцитов с сыворотками анти-c и анти-E, что свидетельствует как бы о гомозиготности C и e. Другой случай гетерозиготности, например *—D—/cDE*, также может быть ошибочно диагностирован как гомозиготный генотип *cDE/cDE* со всеми вытекающими отсюда последствиями. Эта же проблема должна беспокоить судебных медиков и в случаях делеций (повреждение и «стирание» части генного локуса Rh-системы).

Варианты Cc и Ee. R. R. Race и соавт. (1948) описали особые резусные типы эритроцитов, названные ими c^v и C^u. Специфичных антител к этим факторам не найдено, поэтому комплекс c^vDE, который был открыт ранее, можно ошибочно диагностировать как комплекс CDE в редкой генной мозаике *CDE/cde*. Сыворотки, которые не открывали фактор c^v, были специфичными комплексными антителами анти-Ce.

Фактор C^u [по A. S. Wiener — $rh^{(1)}$] представляет собой очень слабую форму фактора C (rh′) с частотой встречаемости около 1%.

Еще один довольно редкий Rh-фактор, названный C^x, обнаружили F. Stratton и P. H. Renton (1954). Он может выявляться специфическими антителами анти-C^x, причем частота встречаемости этого фактора около 0,1%.

В последние годы обнаружены и расовые различия антигенов Rh-системы. Например, эритроциты типа Ccdee (r′r) у белых и негров реагируют различно, причем некоторые сыворотки анти-C не открывают этот резусный тип у негров.

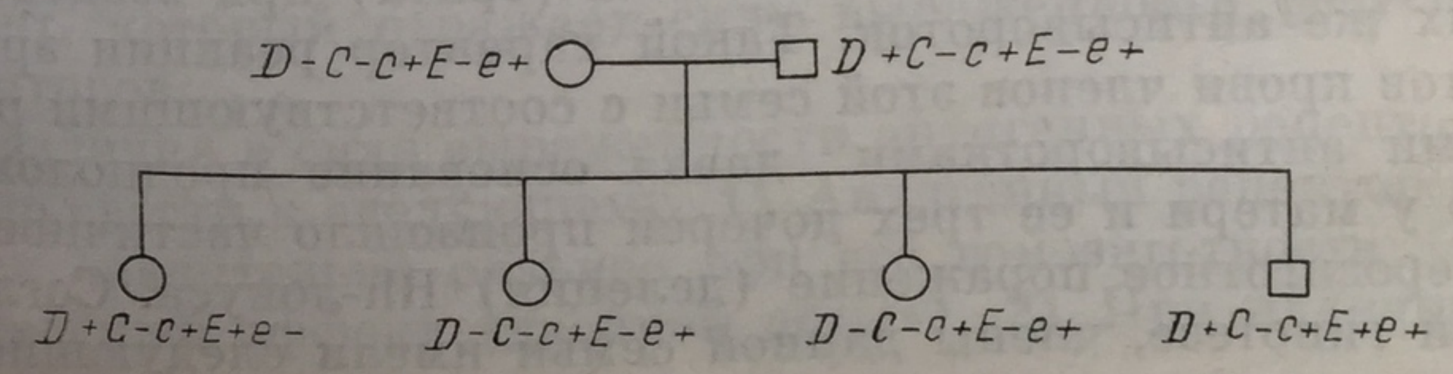
Известны также довольно редкие варианты Rh-фактора E(rh″) E^w, E^u, E^t. M. Shapiro (1960) нашел у народов

Банту особый антиген hr^s, который привлек внимание тем, что факт его генетической передачи опровергает «CDE-теорию наследования» Fisher—Race. Антитела анти-hs^s реагируют приблизительно так же, как антитела анти-hr'' (e), но все же не открывают некоторые образцы эритроцитов, реагирующих с обычной сывороткой анти-hr'' (e). Признак hr^s, по мнению Shapiro, может привести к ошибочному исключению отцовства. Среди европеоидов фактор hr^s, по-видимому, не играет большого значения, поскольку его встречаемость крайне редка.

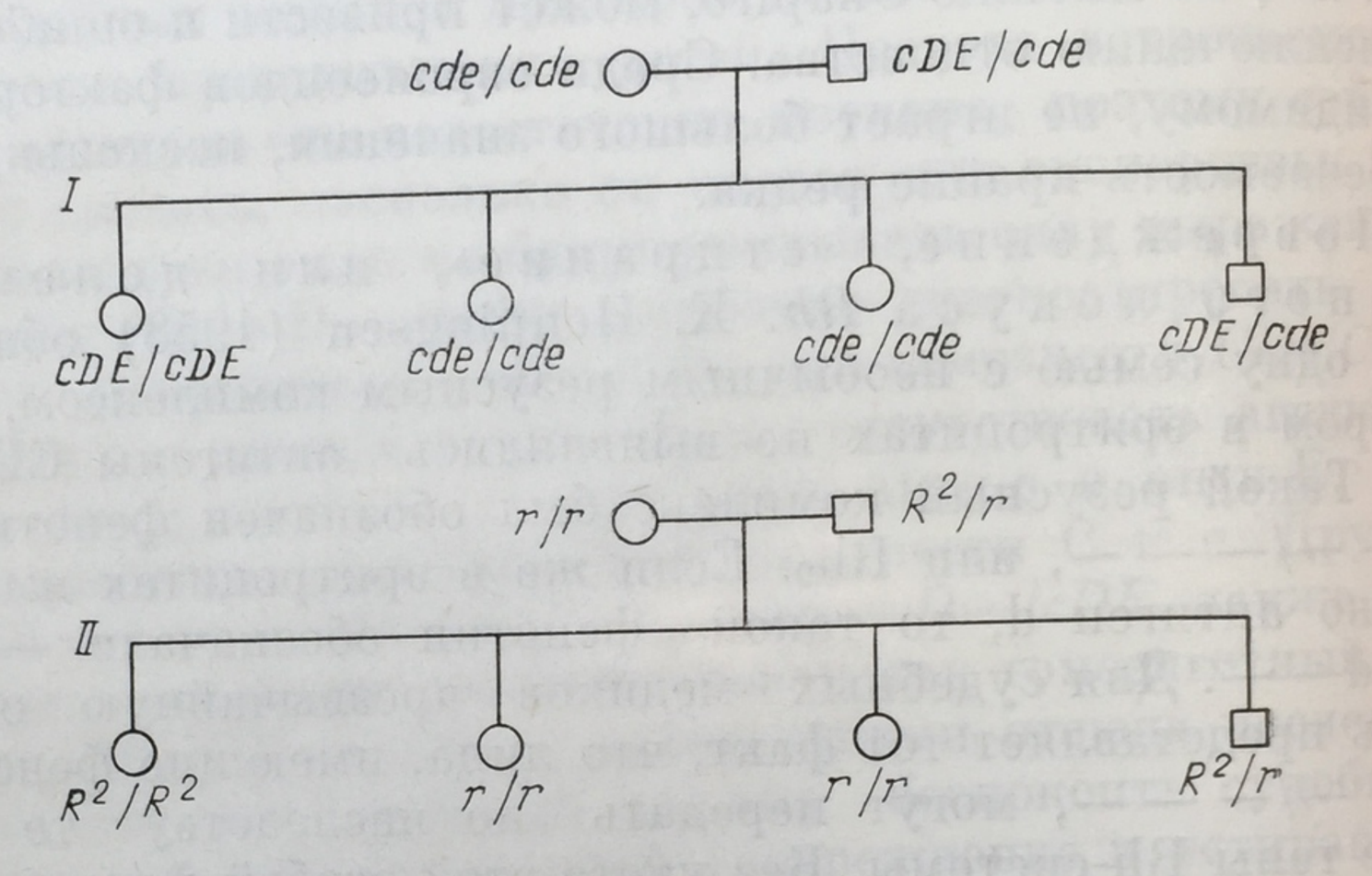
Повреждение, «стирание», или делеции, генного локуса *Rh*. K. Henningsen (1958) обнаружил одну семью с необычным резусным комплексом, при котором в эритроцитах не выявлялись антигены CDE и cde. Такой резусный комплекс был обозначен фенотипом — — —/— — —, или Rh_0. Если же в эритроцитах имелся только антиген d, то такой фенотип обозначали —d—, или d— —. Для судебных медиков чрезвычайную опасность представляет тот факт, что лица, имеющие фенотип — — —/— — —, могут передать по наследству те или иные гены Rh-системы. Без учета этой особой формы часто нельзя объяснить возможность рождения ребенка от конкретной матери. Такие случаи несовместимых пар мать — ребенок, когда замена ребенка полностью исключалась, описали O. Prokop и W. Schneider (1960).

Для судебно-медицинской экспертизы спорного происхождения детей делеции генного локуса Rh, особенно в гетерозиготной форме, приобретают все большее значение. При этом во всех сомнительных случаях необходимо исследовать группы Rh-крови родителей и ближайших родственников, проходящих по делу лиц, а также путем выявления эффекта дозы устанавливать истинный генотип Rh-системы.

J. Jungwirth (1967) описал случай так называемой противоположной гомозиготности антигенов Rh-системы у матери и ребенка, основанной на частичном (гетерозиготном) повреждении Rh-генного локуса:

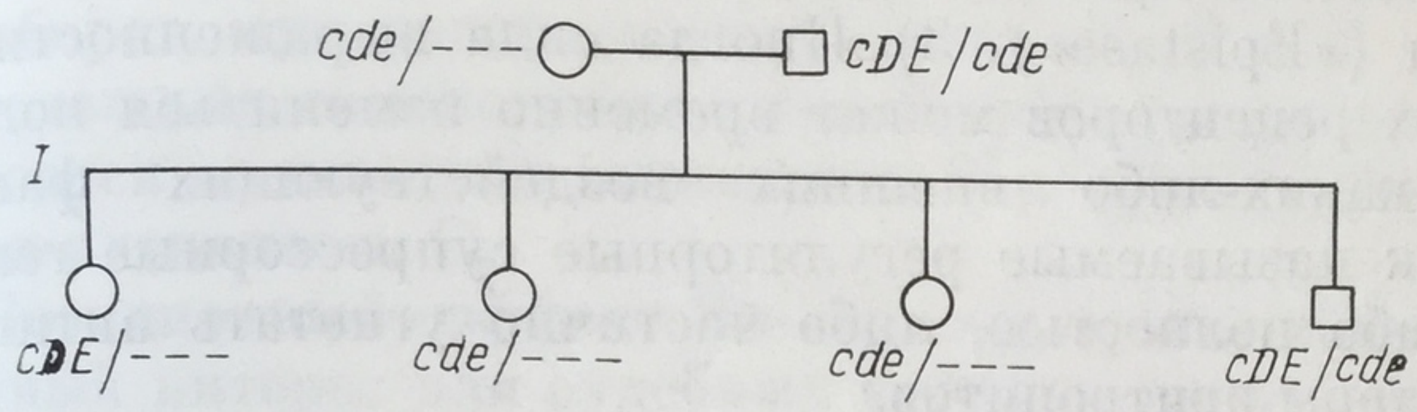


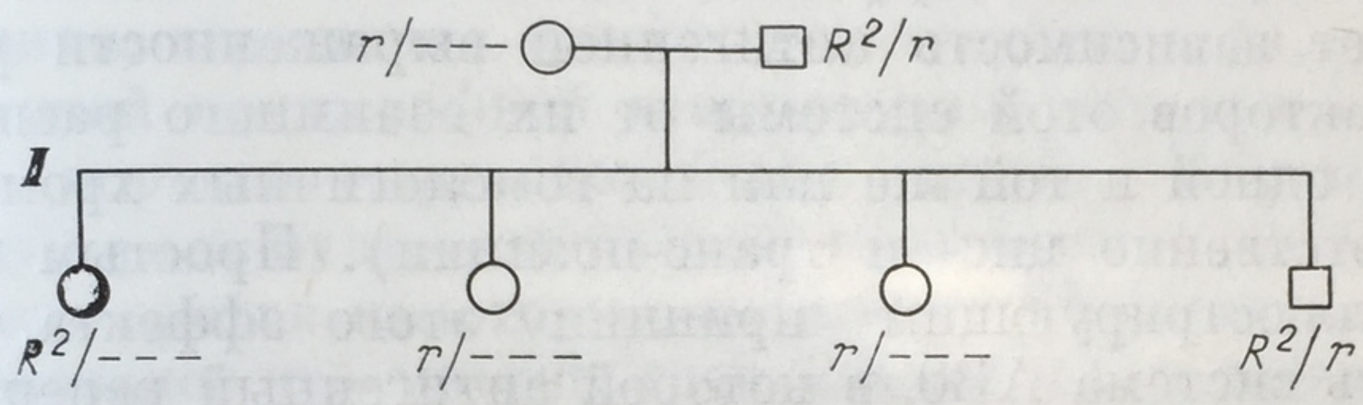
Такие результаты реакции эритроцитов крови с пятью антирезусными антисыворотками (анти-D, анти-C, анти-c, анти-E и анти-e) обычно свидетельствуют о том, что у родителей и четырех их детей имеется следующий резусный генотип (I — по номенклатуре Fisher — Race; II — по номенклатуре Wiener):



То есть первая девочка по всем законам наследования антигенов Rh-системы не могла родиться в этой семье, поскольку у нее и ее матери наблюдается так называемая противоположная гомозиготность резусных антигенов. K. Henninigsen (1958) обратил при этом внимание на следующий факт, который позволил ему генетически правильно интерпретировать указанную выше семью по генотипам Rh и показать возможность рождения этой девочки именно в данной семье. Дело в том, что сыворотки анти-c и анти-e реагировали с эритроцитами крови отца и четвертого ребенка (мальчика) значительно сильнее, чем с эритроцитами крови матери и второй и третьей дочерей, а эритроциты крови первой дочери так же слабо агглютинировались сывороткой анти-c, как эритроциты крови ее матери и двух сестер, но давали с сыворотками анти-D и анти-E агглютинацию, тождественную агглютинации эритроцитов крови отца и мальчика (брата) при воздействии этих же антисывороток. Такой характер реакции эритроцитов крови членов этой семьи с соответствующими резусными антисыворотками давал основание предположить, что у матери и ее трех дочерей произошло частичное или гетерозиготное поражение (делеция) Rh-локуса. Согласно этой гипотезе, члены данной семьи имели следующие ре-

зусные генотипы (I — по номенклатуре Fisher — Race; II — по номенклатуре Wiener).





Таким образом, благодаря выявлению феномена частичного выпадения генного локуса Rh-системы в описанной семье удалось объяснить возможность рождения первого ребенка от данной матери и устранить, казалось бы, очевидную несовместимую резусную гомозиготность (*cde/cde* и *cDE/cDE*) у матери и дочери. Еще одним доказательством в пользу частичного выпадения Rh-локуса в данной семье явился выявленный у отца матери этих четырех детей крайне редкий гомозиготный резусный фенотип Rh_0, или — — —/— — —, который и передал по наследству своей дочери частичное стирание, или выпадение, Rh-локуса.

Необходимо отметить, что до последнего времени описано всего 14 случаев нахождения фенотипа Rh_0, причем у большинства лиц, имеющих этот крайне редкий фенотип, кроме отсутствия в эритроцитах антигенов Rh-системы и LW, были обнаружены и другие генетические дефекты: отсутствие реакции с сывороткой анти-s и анти-U, легкая степень гемолитической анемии.

Так называемый «позиционный» эффект. Одним из наиболее изученным является «позиционный» эффект, который отражает силу выраженности резусных рецепторов.

Различия в силе выраженности антигенных рецепторов можно свести к следующему. 1) Антигенный рецептор выражен значительно сильнее при его гомозиготности (так называемый эффект «двойной дозы»). 2) При наличии в

эритроцитах какого-нибудь определенного антигена одной системы крови антигенная выраженность рецептора другой системы крови может либо усиливаться, либо тормозиться («Epistase»). 3) Иногда сила выраженности антигенных рецепторов может временно измениться под влиянием каких-либо внешних воздействующих факторов. 4) Так называемые регуляторные супрессорные гены могут либо полностью, либо частично угнетать антигенные рецепторы эритроцитов.

«Позиционный» эффект в Rh-системе отчетливо демонстрирует зависимость антигенной выраженности различных факторов этой системы от их взаимного расположения на одной и той же или на гомологичных хромосомах (соответственно цис- и транс-позиции). Простым примером, иллюстрирующим принцип этого эффекта, может служить система АВ0, в которой антигенный рецептор A_1 выражен в генотипе A_1B значительно слабее, чем в генотипах A_1A_1 и A_10. Это обусловлено тем, что антигены A_1 и В имеют довольно близкую химическую структуру, гораздо более близкую, чем структура антигенов A_1 и 0. Вследствие этого при генетической реализации соответствующего генопродукта часть его (или часть основной субстанции) делится между A_1 и В.

По мнению S. D. Lawler и соавт. (1950), это положение приемлемо и к Rh-системе, поскольку авторы нашли антитела анти-Е, которые явно сильнее реагировали с антигеном Е при генотипе *cDE/cde*, чем при генотипе *CDe/cDE*. Теория «общей основной субстанции» подтвердилась в дальнейшем наблюдением довольно редкого генотипа *—D—/—D—*, в котором отсутствовали конкурирующие антигены С, с, Е и е. При этом D-гомозиготном типе сила выраженности антигена D значительно превышала его антигенную выраженность во всех других D-гомозиготных типах, таких, например, как *cDe/cDe*, *CDe/CDe*, *cDE/cDE*, *CDe/cDE*.

При использовании специальных резусных антисывороток можно обнаружить подобный конкурирующий эффект и для антигенов С и Е, химическая структура которых довольно близка. Так, по данным R. R. Race и соавт. (1954), при генотипе *CdE/cde* антигенная выраженность С низкая, а Е — высокая; *Cde/cdE* антигенная выраженность С высокая, а Е — низкая; *CDE/cDe* антигенная выраженность С низкая, а Е — высокая; *CDe/cDE* антигенная выраженность С высокая, а Е — низкая. Эти данные

свидетельствуют о том, что когда C и E располагаются на одной хромосоме (цис-позиция), то угнетается антигенная активность C и повышается антигенная активность E, и, наоборот, при расположении антигенов C и E на противоположных гомологичных хромосомах (транс-позиция) тормозится антигенная активность E и повышается антигенная активность C.

«Позиционный» эффект Rh-системы представляет определенный интерес для судебных медиков, поскольку иногда он позволяет устанавливать резусный генотип конкретного лица, выяснение которого необходимо для использования этой полиморфной генетической системы в экспертизах спорного происхождения детей. В этом плане большую роль будут играть так называемые «сцепленные» антитела против некоторых антигенов Rh-системы.

Показано, что многие антитела анти-C в действительности являются антителами, обладающими двойной специфичностью, и представляют собой сыворотки анти-Ce (анти-rh_i), а некоторые сыворотки анти-E являются антителами анти-CE. Позднее были найдены и другие «сцепленные» антитела — анти-ce (f) и анти-cE (анти-hr_i). С помощью этих сывороток можно выявлять комплексные антигены Rh-системы (табл. 7).

Таблица 7

Обнаружение комплексных антигенов системы резус «сцепленными» антителами

Наличие на хромосоме комплексного антигена или антигенного комплекса	Реакция со «сцепленными» антителами			
	анти-ce	анти-Ce	анти-cE	анти-CE
R′ (CDe)	—	+	—	—
r′ (Cde)	—	+	—	—
R^2 (cDE)	—	—	+	—
r″ (cdE)	—	—	+	—
R° (cDe)	+	—	—	—
r (cde)	+	—	—	—
R^z (CDE)	—	—	—	+
r^y (CdE)	—	—	—	+
Частота положительной реакции среди европеоидов, %	65	70	30	1

Например, используя пять обычных моновалентных антирезусных сывороток (анти-C, анти-c, анти-D, анти-E, анти-e) и получая со всеми ими агглютинацию испытуемых эритроцитов, мы устанавливаем резусный фенотип CcDEe, которому могут соответствовать шесть возможных генотипов: *CDe/cDE, CDe/cdE, Cde/cDE, CDE/cde, CDE/cDe и cDe/CdE*. Используя же только одну «сцепленную» антисыворотку (анти-CE или анти-ce), можно сразу же уменьшить число возможных генотипов в каждом конкретном образце CcDEe до трех, поскольку агглютинация эритроцитов любой из этих двух сывороток исключает генотипические комбинации *CDe/cDE*, *CDe/cdE* и *Cde/cDE*, а отсутствие агглютинации эритроцитов при использовании любой из этих антисывороток исключает генотипы *CDE/cde*, *CDE/cDe* и *cDe/CdE*.

Новая номенклатура Rh-системы. В 1965 г. стало известно, что A. S. Wiener изменил свое негативное отношение к введению новой номенклатуры Rh-системы и признал, что его старая номенклатура символов с открытием многочисленных новых факторов этой системы стала громоздкой, трудночитаемой и даже труднопонимаемой для специалистов. По предложению A. Lauer (1964) в Rh-системе выделяют шесть генов: *Ce*, *cE*, *ce*, *CE*, C^we и C^wE. При этом Lauer сознательно не включал сюда гены, ответственные за мозаику антигена D, поскольку он признавал его обособленность. Естественно, что эта номенклатура с учетом многочисленных особых типов Rh-системы также не будет до конца совершенной, хотя для европеоидного населения со сравнительно меньшей частотой встречаемости особых форм системы она вполне допустима [последняя модель номенклатуры приведена в работе I. Hirschfeld (1973)].

Использование Rh-системы в судебно-медицинской экспертизе спорного происхождения детей. Поскольку Rh-система является чрезвычайно полиморфной генетической системой с большим количеством групповых антигенов, ее можно эффективно использовать в судебно-медицинских экспертизах, связанных со спорным происхождением ребенка. B. Rex-Kiss и E. Horvath (1967) сообщают, что в 1683 судебных процессах по спорному отцовству имелись исключения в 171 случае, среди которых в 156 случаях исключения были получены на основании исследования Rh-системы. По данным Р. С. Сахарова (1968), из 51 экспертизы спорного отцовства по Rh-системе исключения имелись в 9 случаях, причем в большинстве из них (7 из 9) исключение производилось только по данной системе. По результатам наблюдений R. Chakra-

borty (1974), вероятность исключения отцовства в трех расовых группах по Rh-системе с учетом семи важнейших генов R^0, R^1, R^2, R^z, r, r', r'' или генных комплексов *cDe*, *CDe*, *cDE*, *CDE*, *cde*, *Cde*, *cdE* довольно высока и составляет в среднем для европеоидных, негроидных и монголоидных популяций соответственно 27,46; 18,59 и 20,5%.

При применении в судебно-медицинской экспертизе Rh-системы неоднократно возникали различные затруднения, которые впоследствии могли быть объяснены некоторыми вариантами тех или других антигенов. В частности, довольно важное значение имеет антиген C^w, который, по данным Л. К. Аржелас и Е. С. Лутчевой (1964), среди московского населения встречается в 5,9% случаев.

P. Speiser (1955) приводит случай, когда мать имела генотип *CC*, а ее ребенок — *cc*, т. е. образец крови матери давал положительную реакцию с сывороткой анти-C, а с сывороткой анти-c — отрицательную. Образец крови ребенка, наоборот, давал положительную реакцию с сывороткой анти-c и не реагировал с сывороткой анти-C. Таким образом, можно было считать, что данный ребенок не может происходить от этой женщины, так как он обязательно должен был бы наследовать от нее антиген C. Такое исключение имело бы место, если считать, что в генном локусе *C* на соответствующей «резусной» хромосоме имеются только два аллеломорфных аллеля, а именно *C* и *c*, которые ответственны за образование либо гомозиготных форм *CC* или *cc*, либо гетерозиготной формы *Cc*. Однако если учесть, что может иметься и третий аллеломорфный аллель C^w, то в этом случае исключение данной женщины как матери указанного ребенка не безусловно. Действительно, при исследовании, проведенном с применением сыворотки анти-C^w, выяснилось, что у матери и ребенка в крови присутствует антиген C^w, т. е. формула Rh-системы у них следующая: мать CC^wDee, ребенок cC^wDee. Из этих данных видно, что ребенок мог наследовать от матери антиген C^w, который не открывается обычными сыворотками анти-C и анти-c.

Неучитывание антигена C^w таит для судебно-медицинского эксперта большую опасность, поскольку в таком случае возможно ошибочное исключение отцовства (табл. 8). В табл. 8 не указаны случаи, когда могут быть исключения при наличии гомозиготной формы C^w/C^w, встречающейся чрезвычайно редко.

Таблица 8

Возможность ошибочного исключения отцовства по резусным антигенам C и c без учета антигена C^w

Мать	Ребенок	Фенотипы, при которых отец исключается
CC	CC	cc, но если у ребенка C^wC, то отец может быть C^wc
CC	Cc	CC, C^wC
C^wC	cc(C^wc)	CC, C^wc
Cc	CC	cc, но если у ребенка C^wC, то отец может быть C^wc
Cc	cc	CC, но если у ребенка C^wc, то отец может быть C^wC
cc	Cc	cc
cc	cc	CC, но если у ребенка C^wc, то отец может быть C^wC
C^wc	C^wC	cc, C^wc
C^wc	cc	CC, C^wC

Приведенные данные свидетельствуют о том, что при экспертизе спорного происхождения детей судебно-медицинский эксперт не имеет достаточных оснований для исключения отцовства (материнства) по Rh-антигенам C и c без исследования фактора C^w. Данный фактор может быть использован и самостоятельно для исключения отцовства. Так, B. Rex-Kiss и E. Horvath (1966) указывают, что в 50 случаях исследования фактора C^w имелось 5 исключений отцовства по этому антигену.

В литературе описаны случаи, когда, казалось бы, имело место невозможное наследование антигенов Rh-системы, которое впоследствии было объяснено существованием особой формы антигена D. Появление этого антигена обусловлено частичным выпадением Rh-локуса на соответствующей хромосоме. O. Prokop и W. Schneider (1960) при исследовании крови матери и ребенка пятью антирезусными сыворотками на антигены C, c, D, E и e получили следующие результаты: у матери реакция — C+c—D+E—e+, а у ее ребенка совершенно противоположная реакция — C—c+D+E+e—. Такие результаты должны были бы, очевидно, свидетельствовать о том, что мать имеет генотип *CDe/CDe* или *Cde/CDe*, а ребенок — *cDE/cDE* или *cDE/cdE*. В данном случае можно предположить, что мать генотипически гомозиготна по *CC* и *ee*, а ее ребенок — по *cc* и *EE*. Таким образом, по правилам

наследования антигенов Rh-системы можно считать, что ребенок не происходит от данной женщины, хотя возможность ошибочной замены ребенка в родильном доме в данном случае полностью исключалась.

Однако авторы обратили внимание на особую в данном случае реакцию антирезусных сывороток с эритроцитами матери и ребенка: у них была необычно сильная агглютинация эритроцитов сывороткой анти-D. Кроме того, эритроциты матери слабее обычного агглютинировались сыворотками анти-C и анти-e, а эритроциты ребенка также слабее обычного агглютинировались сыворотками анти-c и анти-E. Таким образом, характер реакции эритроцитов крови матери с антисыворотками не соответствовал обычной гомозиготности *CC* и *ee*, а ее ребенка — обычной гомозиготности *cc* и *EE*. Авторы высказали предположение (которое затем было подтверждено при расширенном обследовании родителей и родственников матери этого ребенка), что в данном случае имеет место довольно редкий резусный тип — D—.

Согласно этому предположению, резусный генотип матери был *CDe/—D—*, а ее ребенка — *cDE/—D—*. Таким образом, стало понятным, что в данном случае мать передала по наследству своему ребенку антигенный комплекс —D—.

Имеются данные, указывающие на возможность наследования от одного или даже от обоих родителей хромосомы, вообще не имеющей генов Rh-системы. Они значительно усложняют использование этой системы в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей.

При особом генотипе Rh-системы Rh_0, или — — —/— — —, в эритроцитах нет антигенов CDE и cde, но такой субъект может передавать по наследству другие гены Rh-системы. Этот факт также представляет определенную опасность для экспертизы по Rh-системе.

Во всех сомнительных или не совсем обычных случаях, когда то или иное проходящее по делу лицо либо вообще не имеет антигенов Rh-системы или же его эритроциты дают нетипичную реакцию с соответствующими антирезусными сыворотками, необходимо проводить расширенное исследование родителей и ближайших родственников. Оно способствует выяснению вопроса о вероятности происхождения ребенка от того или иного лица или от той или иной родительской пары.

Определенную опасность для экспертов представляет и особый антиген e^s (hr^s). Большинство обычных резусных сывороток анти-е (анти-hr'') его не открывают, и он реагирует со специальными антителами анти-e^s (анти-hr^s). Если, например, генотип какого-либо лица *cDE/cDe* или *cDE/cde*, то его эритроциты с пятью обычными антирезусными сыворотками анти-С, анти-с, анти-D, анти-Е и анти-е дадут реакцию С—с+D+E+e—, по которой эксперт ошибочно устанавливает генотип этого человека как *cDE/cDE* или *cDE/cdE* со всеми вытекающими отсюда последствиями. Использование специальной сыворотки анти-e^s (анти-hr^s) в таких случаях способствует установлению истинного резусного генотипа конкретного лица. К счастью, встречаемость антигена e^s (hr^s) среди европеоидной популяции чрезвычайно редка, что сводит до минимума возможность ошибочного экспертного заключения, однако при исследовании негроидных популяций с этим обстоятельством приходится считаться.

Примеры возможного предотвращения ошибочного исключения отцовства, когда наряду с сывороткой анти-е (анти-hr'') используется и сыворотка анти-e^s (анти-hr^s), показаны в табл. 9.

Необходимо отметить, что, казалось бы, сугубо теоретические концепции наследования антигенов Rh-системы имеют непосредственное отношение к практическому применению этой сложной полиморфной системы в экспертизах спорного происхождения детей.

На основании огромного числа наблюдений наследственной передачи групповых антигенов Rh-системы в настоящее время почти во всем мире признается правильность генетической концепции A. S. Wiener, согласно которой эта система наследуется при передаче одного гена, обусловливающего развитие определенного антигенного комплекса, характеризующегося несколькими серологическими факторами. Поэтому часто можно решить вопрос о происхождении ребенка, учитывая тот комплекс резусных антигенов, который он мог получить от отца или матери. Более того, исследуя кровь родителей отца и матери ребенка, можно установить, какой антигенный комплекс они передают по наследству, и, исходя из этого, решать, мог ли ребенок имеющийся у него комплекс генов *Rh* получить от того или другого родителя. Примеры такого рода исследований приводят O. Prokop и W. Göhler (1976). По их данным, подобное расширенное исследова-

Таблица 9

Примеры возможного предотвращения ошибок исключения отцовства, когда анти-hr^s применяется вместо анти-hr''

(по M. Shapiro, 1957)

Родители	Дети	Возможные объяснения	
$Rh^0 \times Rh_2Rh_2$	Rh_2Rh_2	$\overset{*}{R}{}^0r \times R^2R^2$	$R^2\overset{*}{R}{}^0$
$Rh_0 \times Rh_2rh$	Rh_2Rh_2	$\overset{*}{R}{}^0r \times R^2r$	$R^2\overset{*}{R}{}^0$
$Rh_0 \times Rh_1Rh_2$	Rh_2Rh_2	$\overset{*}{R}{}^0r \times R^1R^2$	$R^2\overset{*}{R}{}^0$
$rh \times Rh_2Rh_2$	rh	$rr \times R^2\overset{*}{r}$	$\overset{*}{r}r$
$rh \times Rh_2Rh_2$	Rh^0	$rr \times R^2\overset{*}{R}{}^0$	R^0r
$rh \times Rh_2rh$	Rh_2Rh_2	$\overset{*}{r}r \times R^2r$	$R^2\overset{*}{r}$
$rh \times Rh_1Rh_2$	Rh_2Rh_2	$\overset{*}{r}r \times R^1R^2$	$R^2\overset{*}{r}$
$rh \times Rh_2Rh_2$	Rh_0Rh_1rh	$\overset{*}{r}r \times R^2R^0$	$\overset{*}{R}{}^0r$, $r\overset{*}{R}{}^0$
$rh'rh \times Rh_1Rh_2$	Rh_2Rh_2	$\overset{*}{r}r \times R^1R^2$	$R^2\overset{*}{r}$
$rh''rh \times Rh_2Rh_2$	Rh_0	$r^0r \times R^2\overset{*}{R}{}^0$	$\overset{*}{R}{}^0r$
$Rh_1Rh_2 \times Rh_2Rh_2$	Rh_1rh	$R^1R^2 \times R^2\overset{*}{R}{}^0$	$R^1\overset{*}{R}{}^0$
$Rh_1Rh_2 \times Rh_1Rh_2$	Rh_1RR_1	$R^1R^2 \times R^1R^2$	$\overset{*}{R}{}^1R^1$

Примечание. * обозначены фенотипы с антигеном e^s.

ние крови родителей предполагаемого отца и матери ребенка, а также их братьев и сестер и братьев и сестер спорного ребенка примерно в 50% случаев дало возможность получить дополнительные сведения относительно происхождения ребенка. По нашему мнению, это является обязательным условием при проведении судебно-медицинских экспертиз крови в делах о спорном происхождении ребенка и применительно не только к Rh-системе, но и к большинству изосерологических, сывороточных и ферментных систем крови, используемых в такого рода исследованиях.

Указанные выше особенности наследования групповых антигенов Rh-системы, открытие большого числа новых антигенов, относящихся к этой системе, во-первых, осложняют ее применение в судебно-медицинской экспертизе спорного происхождения детей и, во-вторых, требуют от эксперта при оценке полученных данных четкого представления и знания многочисленных особенностей этой исключительно сложной изосерологической системы.

В настоящее время, по-видимому, назрела необходимость принципиального решения вопроса о квалификации судебно-медицинских экспертов, которым может быть поручено установление спорного происхождения детей по групповым наследственным серологическим факторам. Они должны иметь не только специальную подготовку по лабораторной технике выявления серологических факторов, но и обширные знания в области наследования групповых антигенов различных изосерологических, сывороточных и ферментных систем крови человека. Поясним свою мысль конкретным примером исследования антигенов Rh-системы при проведении судебно-медицинской экспертизы спорного отцовства.

Кровь ребенка, его матери и трех мужчин, фигурирующих в качестве предполагаемого отца ребенка, при исследовании пятью антирезусными сыворотками анти-C, анти-c, анти-D, анти-E и анти-e дает серологическую реакцию:

ребенок	C+c+D—E+e+
мать	C+c+D+E—e+
ответчик I	C+c+D+E+e+
ответчик II	C—c+D+E+e+
ответчик III	C—c+D+E+e—

Рассуждения эксперта, не учитывающего комплексность Rh-антигенов и частоту их встречаемости, а рассматривающего только отдельные факторы этой системы, будут приблизительно следующими. У ребенка в резусной формуле имеется резусный рецептор E, отсутствующий у его матери. Следовательно, он мог получить его только от отца. Поскольку все трое мужчин, фигурирующих в качестве предполагаемого отца ребенка, содержат в своей крови фактор E, то в данном случае исключение всех трех ответчиков в качестве отца по данной системе невозможно. В таких рассуждениях, вроде бы совершенно логичных, эксперт не учел редкой резусной формулы ребенка, а оценивал лишь отдельные факторы Rh-системы, которые сами по себе не имеют первостепенного значения для выяснения возможности рождения ребенка от конкретной родительской пары. Серологическая реакция эритроцитов крови ребенка с антирезусными сыворотками свидетельствует о том, что он имеет один из двух возможных резусных генотипов *Cde/cdE* ($r'r''$) или *CdE/cde* ($r^{y}r$) с частотой встречаемости соответственно 0,023 и 0%. Резусная формула матери ребенка показывает, что мать имеет один

из двух возможных генотипов *CDe/cde* ($R'r$) или *cDe/Cde* (R^0r') с частотой встречаемости соответственно 31,675 и 0,05%. Как далее рассуждает эксперт? Он отмечает, что его предположения вполне допустимы, поскольку, если у матери генотип *CDe/cde* ($R'r$), то у ее ребенка генотип *CdE/cde* ($r^{y}r$), причем она передала ребенку генный комплекс *cde* или ген r, а генный комплекс *CdE* (ген r^{y}) ребенок получил от отца. Если же у матери генотип *cDe/Cde* (R^0r'), то у ее ребенка генотип *Cde/cdE* ($r'r''$), и в таком случае он получил генный комплекс *Cde* или ген r' от матери, а генный комплекс *cdE* или ген r'' — от отца.

Следовательно, на данном этапе исследования эксперту уже известно, что отцом ребенка является мужчина, имеющий в своем резусном генотипе генные комплексы *CdE* или *cdE* (гены r^{y} или r''). Очевидно, что для дальнейшего уточнения резусного генотипа отца эксперту необходимо решить, какой именно из двух возможных резусных генотипов имеет мать и ее ребенок. Как решает этот вопрос высококвалифицированный эксперт? Во-первых, он знает, что один из двух возможных резусных генотипов ребенка (*CdE/cde* или $r^{y}r$) почти гипотетичен, поскольку он реален только теоретически, но до настоящего времени ни у кого еще не обнаружен. Второй возможный резусный генотип ребенка тоже редок (*Cde/cdE* или $r'r''$), но он встречается во много раз чаще, чем чисто теоретический генотип *CdE/cde* или $r^{y}r$. Уже из одного этого вытекает наибольшая вероятность того, что у ребенка имеется генотип *Cde/cdE* ($r'r''$), а у его матери — генотип *cDe/Cde* (R^0r'). При этом генный комплекс *Cde* (ген r') ребенок унаследовал от матери, а генный комплекс *cdE* (ген r'') — от своего отца. Поскольку это все же только вероятное предположение (хотя весьма аргументированное), то оно, естественно, не может лечь в основу судебно-медицинского экспертного заключения, которое на современном уровне развития серологии и генетики должно быть более конкретным и доказательным.

Какова же дальнейшая тактика квалифицированного эксперта в этом случае? Он знает о существовании так называемого «позиционного» эффекта в Rh-системе (см. выше), при котором наблюдается отчетливое варьирование силы выраженности антигенов *C* и *E* в зависимости от того, в какой позиции, цис- или транс-, располагаются на хромосомах гены *C* и *E*. При наличии генов *C* и *E* на

одной и той же хромосоме в цис-позиции в эритроцитах резко повышается сила выраженности антигена E по сравнению с антигеном C, и, наоборот, при расположении генов C и E на противоположных гомологичных хромосомах в эритроцитах увеличивается сила выраженности антигена C и снижается выраженность антигена E.

Некоторые антирезусные сыворотки анти-C и анти-E хорошо улавливают эти различия и с их помощью эксперт может устанавливать резусный генотип конкретного лица. Так, в рассматриваемом выше примере резусный генотип ребенка может быть либо *Cde/cdE* ($r'r''$), либо *CdE/cde* ($r^{y}r$). Используя сыворотки анти-C и анти-E, улавливающие «позиционный» эффект, эксперт отмечает, что эритроциты крови ребенка гораздо сильнее агглютинируются сывороткой анти-C, чем сывороткой анти-E. Из этого он делает вывод, что ребенок имеет генотип *Cde/cdE* ($r'r''$), его мать — генотип *cDc/Cde* (R^0r') и при этом генный комплекс *Cde* или ген r' ребенок унаследовал от матери, а генный комплекс *cdE* или ген r'' от своего отца.

Если у эксперта в распоряжении нет сывороток анти-C и анти-E, улавливающих «позиционный» эффект, он найдет другую возможность установления резусного генотипа ребенка, его матери, а следовательно, и того генного комплекса или гена, который ребенок получил от отца. В этом ему помогут так называемые «сцепленные» антитела (см. выше) анти-ce, анти-CE, анти-cE или анти-Ce, открывающие в эритроцитах соответствующие антигены только тогда, когда гены, ответственные за их появление, располагаются на одной и той же хромосоме, несущей резусную информацию. Используя любую из четырех указанных антисывороток в реакции с эритроцитами крови ребенка, эксперт легко устанавливает ту же самую генотипическую резусную характеристику ребенка и его матери [соответственно *Cde/cdE* ($r'r''$) и *cDe/Cde* (R^0r')] и вновь убеждается в том, что от отца ребенок наследует только генный комплекс *cdE* или ген r''. Действительно, положительная реакция эритроцитов крови ребенка с сывороткой анти-Ce или анти-cE или же их отрицательная реакция с сыворотками анти-CE или анти-ce сразу же устанавливает точный резусный генотип ребенка *Cde/cdE* ($r'r''$) и исключает второй возможный генотип *CdE/cde* ($r^{y}r$).

Имеется еще один путь установления точного генотипа матери ребенка — исследование Rh-факторов у ее близ-

ких родственников, главным образом родителей, братьев и сестер. Так, в описанном примере эритроциты крови ее отца давали с антирезусными сыворотками реакцию C—c+D+E—e+, что свидетельствовало о том, что резусный генотип деда ребенка мог быть либо *cDe/cde* (R^0r), либо *cDe/cDe* (R^0R^0). Эритроциты крови бабушки ребенка давали с антирезусными сыворотками реакцию C+c+ +D—E—e+. Это в свою очередь свидетельствует о том, что мать может иметь только генотип *Cde/cde* ($r'r''$). Исследование крови дяди ребенка (брата его матери) показало, что он имеет генотип *cde/cde* (rr). Это свидетельствовало о том, что его отец (дед ребенка) мог иметь только генотип *cDe/cde* (R^0r), а не *cDe/cDe* (R^0R^0). Таким образом, расширенное исследование родословной этой семьи позволяет эксперту (без применения специальных антисывороток) точно установить резусные генотипы всех ее членов и прийти к тому же доказательному выводу: мать ребенка имеет генотип *cDe/Cde* (R^0r'), причем *cDe* (R^0) — отцовский, а *Cde* (r') — материнский, поскольку генотипы ее отца и матери были соответственно *cDe/cde* (R^0r) и *Cde/cde* ($r'r$), а ее ребенок имел генотип *Cde/cdE* ($r'r''$), в котором *Cde* (r') от матери, а *cdE* (r'') от отца.

Теперь эксперту совершенно ясно, что при исследовании резусной мозаики трех мужчин, каждый из которых фигурирует в качестве предполагаемого отца ребенка, необходимо выяснить, имеет или нет каждый из них на одной из двух гомологичных хромосом, ответственных за резусную информацию, генный комплекс *cdE* (ген r''). Другими словами, имеет или не имеет каждый из них в своем резусном генотипе генный комплекс *cdE* или ген r''. От выяснения этого вопроса во многом зависит экспертное заключение о том, мог ли конкретный мужчина явиться отцом данного ребенка или же его отцовство в отношении этого ребенка исключается.

Резусному фенотипу ответчика I CcDEe, характеризующемуся наличием в его эритроцитах по крайней мере пяти Rh-факторов, могут соответствовать шесть возможных генотипов, представленных по порядку в соответствии с частотой их встречаемости среди населения Земного шара: *CDe/cDE* (R^1R^2) — 11,50%, *CDe/cdE* ($R'r''$) — 0,97%, *cDE/Cde* (R^2r') — 0,28%, *CDE/cde* (R^zr) —0,19%, *CDE/cDe* (R^zR^0) — 0,01%, *cDe/CdE* (R^0r^y) — 0%. Из этого перечня видно, что ответчик I может быть отцом ребенка только в том случае, если у него имеется генотип

CDe/cdE ($R'r''$). В этом случае эксперт должен использовать все возможные способы для выяснения точного резусного генотипа ответчика. При этом опять же учитывается частота встречаемости теоретически возможных генотипов, применяются специальные серологические реагенты для уточнения резусного генотипа, а также проводится расширенное обследование ближайших родственников ответчика.

В конкретном примере эксперт, используя сыворотки анти-С и анти-Е, по преобладанию в эритроцитах ответчика антигенной выраженности С над Е устанавливает транс-локализацию соответствующих генов на гомологичных хромосомах и исключает три последние из шести возможных генотипические комбинации Rh-системы. Это также подтверждается реакцией эритроцитов с любой «сцепленной» резусной атисывороткой (отсутствие агглютинации эритроцитов с сыворотками анти-CE и анти-ce или же агглютинация эритроцитов сыворотками анти-Ce и анти-cE). Вопрос о том, какой конкретный резусный генотип (из оставшихся трех возможных генотипических комбинаций) имеет ответчик I, эксперт решает путем расширенного обследования его близких родственников. При этом он устанавливает, что его мать имеет генотип *Cde/cde* ($r'r$) (по реакции C+c+D—E—e+). Следовательно, ее сын, фигурирующий в качестве ответчика I, может иметь только резусный генотип *cDE/Cde* (R^2r'), что исключает его в качестве отца ребенка.

Приблизительно так же решается вопрос и об ответчике II. Эксперт по реакции эритроцитов с антирезусными сыворотками (C—c+D+E+e+) видит, что этот мужчина может иметь один из трех возможных резусных генотипов *cDE/cde* (R^2r) с частотой встречаемости 10,97%, *cDe/cDE* (R^0R^2) с частотой встречаемости 0,72% или *cDe/cdE* (R^0r'') с частотой встречаемости 0,06%. Более того, эксперт понимает, что первые две генотипические характеристики исключают ответчика II как отца ребенка, а третья не исключает отцовства. Эксперт видит также, что в данной ситуации он не может рассчитывать на «сцепленные» антитела и антирезусные сыворотки, выявляющие «позиционный» эффект. Поэтому ему приходится ориентироваться на частоту встречаемости возможных для ответчика II резусных генотипов и главным образом на расширенное исследование его ближайших родственников. Частота распространения возможных для ответчика гено-

типов, конечно же, настраивает эксперта на то, что, по-видимому, этот мужчина не является отцом данного ребенка, поскольку единственно возможный резусный генотип *cDe/cdE* (R^0r''), при котором отцовство не исключается, чрезвычайно редок. Исследование резусной формулы матери ответчика (C—c+D—E—e+) подтверждает правильность предположений, поскольку ее резусный генотип *cde/cde* (*rr*) определяет и резусный генотип ее сына *cDE/cde* (R^2r), что исключает ответчика II в качестве отца ребенка.

Ответчик III с эритроцитарной реакцией C—c+D—E+e+ мог иметь только один из двух возможных генотипов *cDE/cDE* (R^2R^2) или *cDE/cdE* (R^2r''), причем в первом случае он исключался как отец ребенка, а во втором, учитывая крайнюю редкость резусных генотипов ребенка и родителей ответчика III, отцовство последнего в отношении данного ребенка практически доказано. Исследование ближайших родственников ответчика показало, что его мать и сестра имеют резусный генотип *cdE/cde* ($r''r$) [это было установлено по их эритроцитарной реакции C—c+D—E+e+ с антирезусными сыворотками]. Так было доказано, что ответчик III имеет генотип *cDE/cdE* (R^0r'') и, следовательно, он мог передать ребенку генный комплекс *cdE* или ген r''.

Приведенный пример наглядно демонстрирует, что только глубокое знание возможных генотипических комбинаций Rh-системы при расширенном исследовании резусных фенотипов не только у проходящих по делу лиц, но и у их ближайших родственников поможет вполне аргументированно решить вопрос о возможности или невозможности происхождения ребенка от определенной родительской пары.

Глава 5

СИСТЕМА КЕЛЛ—ЧЕЛЛАНО

Настойчивые поиски неполных антител, «открывающих» новые антигены в эритроцитах крови человека, были особенно успешными после разработки антиглобулинового теста — непрямой пробы Кумбса. Исследуя при помощи этого теста сыворотки крови женщин, родивших детей с гемолитической болезнью новорожденных, R. R. Coombs и соавт. (1946) обнаружили новое неполное антитело, названное ими по фамилии женщины, у которой оно впер-

вые было обнаружено, антителом анти-Келл. Позднее подтвердилось, что антитела анти-Келл могут являться причиной гемолитической болезни новорожденных. Антиген Келл является довольно сильным. Это подтверждают исследования L. Kornstad и H. Heistö (1957), изучивших сыворотки крови 106 Келл-отрицательных реципиентов, которым 6—14 мес до исследования была перелита донорская кровь. В 4 случаях Келл-отрицательным пациентам была перелита Келл-положительная кровь, что вызвало образование соответствующих антител. Антиген K (Келл) среди европейских народов встречается в 5—10% случаев и передается по наследству. Антиген K среди различных народов встречается относительно редко, поскольку во всем мире не найдена ни одна популяция, в которой частота встречаемости антигена K превышала бы 13%. У аборигенов Австралии, индейцев Америки, эскимосов и в монголоидных популяциях антиген K не обнаружен, а в негроидных популяциях он встречается гораздо реже, чем у белого европеоидного населения.

P. Levine и соавт. (1949) обнаружили в крови женщины по фамилии Челлано иммунное антитело, которое реагировало почти со всеми исследованными образцами крови различных людей и не агглютинировало лишь эритроциты 5 из 2500 обследованных лиц. Установлено, что антитело анти-Челлано является противоположным по своей серологической реакции антителу анти-K, поэтому его стали обозначать как анти-k (H. Heistö et al., 1957). Антигены K и k полностью независимы от других изосерологических групповых систем крови человека, не сцеплены также с системой выделительства и с полом.

До 1957 г. система Келл — Челлано представлялась довольно простой двуаллельной генетической системой с тремя возможными генотипами *KK*, *Kk* и *kk*, фенотипически проявляющейся из-за доминирования *K* над *k* лишь двумя группами *K*+ и *K*—. После того как в этой системе было открыто много других антигенов, она значительно усложнилась: для системы Келл предложено несколько номенклатур.

В 1957 г. F. H. Allen и Sh. J. Lewis обнаружили фактор Kp^a, частота встречаемости которого среди европейского населения составила всего 2%. Вычислено, что гомозиготный тип по этому признаку может встретиться приблизительно с частотой 1 : 10 000. F. H. Allen и соавт. (1958) сообщили о нахождении ими нового антитела, кото-

рое образовалось, по-видимому, у Kp^a-гомозиготного носителя по фамилии Раутенберг после многочисленных переливаний ему донорской крови. Это антитело, названное анти-Kp^b, «открыло» в эритроцитах противоположный Kp^a-фактору антиген, названный антигеном Kp^b. Частота встречаемости антигена Kp^b среди европейского населения составляет 99,98%.

B. Chown и соавт. (1957) обнаружили совершенно необычный фенотип системы Келл K—, k—, Kp(a—b—), который был назван фенотипом K^0. Предполагают, что он обусловлен действием особого гена этой системы, обозначенным K^0. P. A. Corcoran и соавт. (1961) обнаружили в сыворотке крови человека по фамилии Пельтц, имевшего фенотип K^0, необычное антитело, агглютинирующее все без исключения исследованные эритроциты, кроме собственных. Это антитело авторы назвали анти-Ku, или анти-Пельтц. У второго человека с фенотипом K^0 по фамилии Мак Леод, по мнению F. H. Allen и соавт. (1961), был какой-то новый вариант k и Kp^b. Вторую сыворотку анти-Ku обнаружили H. D. Nunn и соавт. (1966), причем она была выделена также от женщины с фенотипом K^0. M. Stroup и соавт. (1965) установили, что эритроциты людей с фенотипом K^0 не реагируют также с антителами анти-Js^a и анти-Js^b, выявляющими групповые антигены системы Sutter (в которой антиген Ja^a тождествен антигену Sutter, а антиген Js^b — антигену Matthews). На основании этого было высказано предположение о том, что система Sutter с ее групповыми антигенами Js^a и Js^b также относится к системе Келл. Справедливость этого предположения была подтверждена многочисленными семейными обследованиями.

Фактор Sutter, или антиген Js^a, был открыт E. R. Giblett в 1958 г. среди негритянского населения. Интересно, что в то время как приблизительно 20% негров являются Js (a+), все люди других рас относятся к Js (a—). Предсказанное заранее противоположное антитело анти-Js^b, открывающее аллельный антигену Js^a антиген Js^b, открыли R. H. Walker и соавт. (1963). С его помощью было установлено, что почти 99% негроидов являются Js (b+), а в крови европеоидов (из 1005 обследованных) в 100% случаев содержится антиген Js^b.

После включения групповых антигенов системы Sutter в систему Келл назрела необходимость в новой номенклатуре и новой генетической концепции наследования анти-

генов системы Келл. Такую номенклатуру разработали N. E. Morton и соавт. (1965) (табл. 10). В настоящее

Таблица 10

Гены и антигены системы Келл

Гены			Антигены						
по F. Allen	по R. Race	по S. Rosenfeild	K K_1	k K_2	Kp^a K_3	Kp^b K_4	Ku K_5	Js^a K_6	Js^b K_7
K^b	K	K: 1, —2, —3, 4, 5, —6, 7	+	—	—	+	+	—	+
k^b	k	K: —1, 2, —3, 4, 5, —6, 7,	—	+	—	+	+	—	+
k^a	$k^p(k^a)$	K: —1, 2, 3, —4, 5, —6, 7	—	+	+	—	+	—	+
k^S	k^S	K: —1, 2, —3, 4, 5, 6, —7	—	+	—	+	+	+	—
K^0	K^0	K: —1, —2, —3; —4, —5, —6, —7	—	—	—	—	—	—	—
Mc Leod	K^m	K: —1, 2, —3, 4, —5, —6, 7	—	+	—	+	—	—	+
K^a	$K^p(K^a)$	K: 1, —2, 3, —4, 5, —6, 7	+	—	+	—	+	—	+
K^S	K^S	K: 1, —2, —3, 4, 5, 6, —7	+	—	—	+	+	+	—
k^{as}	$k^{Ps}(k^{as})$	K: —1, 2, 3, —4, 5, 6, —7	—	+	+	—	+	+	—
K^{as}	K^{Ps}	K: 1, —2, 3, —4, 5, 6, —7	+	—	+	—	+	+	—

Примечание. Четыре последних типа теоретически возможны, но до настоящего времени еще не обнаружены.

время антигенам системы Келл присвоены следующие обозначения:

K_1=K = Kell
K_2=k = Cellano,
K_3=Kp^a= Penney,
K_4=Kp^b= Rautenberg,
K_5=Ku = Peltz,
K_6=Js^a = Sutter,
K_7=Js^b = Matthews.

В последние годы в систему Келл включены новые факторы. Van der M. Hart и соавт. (1968) обнаружили антитело, реагировавшее с эритроцитами всех известных типов системы Келл, включая даже эритроциты типа K^0,

но не агглютинирующее эритроциты типа McLeod. U. Furuhjelm et al. (1968) выявили новый антиген этой системы, названный Ul^a (Karhula). В настоящее время описаны еще три новых фактора, которые связаны с системой Келл, K_{12}, K_{13} и Wk^a (Weeks). Таким образом, система Келл стала довольно сложной изосерологической системой с большим количеством групповых антигенов, передающихся по наследству.

Однако для судебно-медицинских экспертных целей и в первую очередь для судебно-медицинской экспертизы спорного происхождения детей практическое значение имеют лишь два антигена этой системы K и k (по новой номенклатуре K_1 и K_2). Причем из-за относительной редкости антигена K (K_1) среди населения Земного шара вероятность исключения отцовства по двум антигенам этой системы будет невелика. Так, по данным R. Chakraborty et al. (1974), эта величина по системе Келл при использовании только одной антисыворотки анти-K в трех основных расовых группах следующая: 3,54% для европеоидной, 0,49% для негроидной и 0% для монголоидной.

Глава 6
СИСТЕМА ЛЮТЕРАН

S. Callender, T. Sheila и R. R. Race (1946) обнаружили в сыворотке крови одной пациентки после многочисленных переливаний ей донорской крови смесь многих иммунных антител. У донора по фамилии Лютеран в эритроцитах содержался ранее неизвестный антиген, который вызывал выработку соответствующих антител. Эти антитела были полными и реагировали с соответствующими эритроцитами в солевой среде. K. R. Mainwaring и M. M. Pickles (1948) повторно нашли антитела с подобной специфичностью, «открывающие» в эритроцитах антиген Lu^a, названный так по фамилии донора, кровь которого вызвала образование специфичных антител, обозначенных анти-Lu^a.

Вначале система Лютеран представлялась системой одного фактора, подразделяющего всех людей на два фенотипа: Lu(a+), содержащих антиген Lu^a, и Lu(a—), не имеющих этого антигена. Однако M. Cutbush и J. Chanarin (1956) нашли спонтанные антитела анти-Lu^b. Частота антигена Lu^b среди европеоидной расы чрезвычайно вели-

ка и составляет около 99,9%, а антигена Lu^a — всего 4—9%.

Система Лютеран, как и многие другие изосерологические системы крови человека, оказалась значительно более сложной, чем казалось сначала. Уже в 1961 г. J. Mohr выявил генетическую корреляцию между системами Льюис, выделительства и антигеном Lu^a. Позднее тесное сцепление генных локусов, контролирующих полиморфизм систем Лютеран и выделительства, было подтверждено другими исследователями.

M. N. Crawford и соавт. (1961) обнаружили необычный фенотип Lu(a—b—) у членов одной семьи. Детальное изучение этой семьи позволило выявить две любопытные особенности. Во-первых, появление типа Lu(a—b—), по-видимому, обусловлено действием особого доминантного гена и, во-вторых, у лиц с фенотипом Lu(a—b—) в эритроцитах отсутствует чрезвычайно распространенный фактор Au^a системы Auberger. J. Darnborough и соавт. (1963) выявили в крови другого человека с редким фенотипом Lu(a—b—) необычное антитело анти-Lu^a Lu^b, реагировавшее со всеми фенотипами системы Лютеран [Lu(a+b—), Lu(a—b+), Lu(a+b+)], за исключением фенотипа Lu(a—b—). Попытки разделить его путем абсорбции на обычные антитела анти-Lu^a и анти-Lu^b не увенчались успехом. В настоящее время это антитело обозначают анти-Lu_3, поскольку считают, что оно реагирует с гипотетичным веществом — предшественником-3 (см. далее). Дальнейшее изучение семей, члены которых имели необычный фенотип Lu(a—b—), показало, что существуют два типа Lu(a—b—) — доминантный и рецессивный, причем только при наличии доминантного типа Lu(a—b—) антиген Au^a отсутствует.

P. A. Tippet (1971) открыл чрезвычайно интересный генетический феномен в системе Лютеран, при котором мать с фенотипом Lu(a—b—) передала по наследству двум своим детям ген Lu^b, а третьему ребенку ген Lu^a. Это свидетельствовало о том, что мать генотипически являлась Lu^aLu^b [при фенотипической характеристике Lu(a—b—)!]. В настоящее время считают, что появление фенотипа Lu(a—b—) обусловлено действием особого доминантного супрессорного гена, передающегося по наследству, причем его локус не находится в генном локусе системы Лютеран. Интересным представляется и тот факт, что в семьях, члены которых имеют необычный фе-

нотип Lu(a—b—), наблюдается повышенное число людей с фактором P_2, хотя система P генетически полностью независима от системы Лютеран и других генетических систем. Некоторые авторы допускают возможность появления фенотипа Lu(a—b—) не только за счет генетического супрессорного воздействия, но и за счет изменения поверхности эритроцитов, затрудняющего их реакцию с антисыворотками анти-Lu^a и анти-Lu^b.

В 1971—1972 гг. были обнаружены шесть совершенно необычных антител, которые реагировали с большинством групповых антигенов различных генетически обусловленных систем крови, т. е. обладали исключительно широким спектром антигенной специфичности. Однако все они не реагировали с эритроцитами Lu(a—b—), которые, естественно, имели на своей поверхности огромный набор групповых антигенов различных изосерологических систем. О чем мог свидетельствовать этот факт? Только о том, что эти антитела имеют какое-то отношение к системе Лютеран. Кроме того, он свидетельствовал о том, что для антигенной выраженности факторов Lu^a и Lu^b необходим один и тот же антиген-предшественник.

В последние годы список групповых антигенов, относящихся к системе Лютеран, значительно пополнился. Были открыты антигены Lu_4, Lu_5, Lu_6, Lu_7, Lu_8, Lu_9, Lu_{10}, Lu_{11}. Выявление фактора Lu_9 чрезвычайно затруднительно, вероятно, благодаря крайне слабой реакции таких эритроцитов с сыворотками анти-Lu_9.

M. Metaxas и M. Bühler (1972) обнаружили семью, в которой в четырех поколениях наблюдалась прямая наследственная передача чрезвычайно редкого антигена Swann (Sw^a) совместно с антигеном Lu^a. В связи с этим было высказано предположение о том, что антиген Sw^a также должен входить в систему Лютеран. По мнению авторов, антиген Sw^a является противоположным (антитетичным) широко распространенным антигеном этой системы.

M. Sinclair и соавт. (1973) описали новый фактор «Much», имеющий определенную корреляцию с системой Лютеран. Однако многие исследователи считают, что генный локус этого фактора является самостоятельным, не входит ни в генный локус системы Лютеран, ни в секреторный генный локус, но расположен на соответствующей хромосоме очень близко к этим локусам.

Сложное генетическое взаимодействие в системе Люте-

ран в настоящее время объясняют следующим образом. Из вещества-предшественника-1 под воздействием соответствующего гена формируется вещество-предшественник-2. Из одной части вещества-предшественника-2 под действием гена Au^a образуется антиген Au^a системы Auberger, а из другой его части под воздействием особого гена образуется вещество-предшественник-3, которое, по мнению многих иммуногенетиков, может служить причиной образования особого антитела анти-Lu_3. Это антитело реагирует с эритроцитами Lu(a+b—), Lu(a—b+) и Lu(a+b+) и не реагирует с эритроцитами Lu(a—b—). Вещество-предшественник-3 является исходным материалом для образования всех антигенов системы Лютеран под воздействием соответствующих генов (Lu^a, Lu^b, Lu_4, Lu_5 и т. д.). При наличии доминантного супрессорного гена, блокирующего переход вещества-предшественника-1 в вещество-предшественник-2, образование групповых антигенов систем Лютеран и Auberger невозможно. При гомозиготности по рецессивному супрессорному гену, блокирующему образование вещества-предшественника-3 из вещества-предшественника-2, могут образовываться групповые антигены лишь системы Auberger, но не системы Лютеран.

Однако в обоих этих случаях наследственная передача генов, ответственных за появление у ребенка соответствующих антигенов систем Лютеран и Auberger, вполне реальна. Этот факт представляет определенную опасность для судебных медиков, поскольку в крови ребенка могут выявляться групповые антигены Lu или Au, отсутствующие в крови его родителей. Поэтому во всех случаях обнаружения у матери ребенка или ответчика, фигурирующего в качестве предполагаемого отца, необычного фенотипа Lu(a—b—) для правильного решения вопроса о возможности или невозможности рождения ребенка от конкретной родительской пары необходимо изучить групповую характеристику ближайших родственников этого лица по системам Лютеран и Auberger для выяснения его истинного генотипа по этим системам.

В настоящее время система Лютеран уже нашла свое применение в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей. При этом в основном исследуют два антигена Lu^a и Lu^b, которые разделяют всех людей на три фенотипические группы: Lu(a+b—) с генотипом Lu^aLu^a; Lu(a+b+) с генотипом Lu^aLu^b и Lu(a—b+) с

генотипом Lu^bLu^b. Частота их встречаемости в различных популяциях далеко не одинакова. Из-за относительной редкости антигена Lu^a среди населения Земного шара и исключительной распространенности антигена Lu^b процент вероятного исключения отцовства по системе Лютеран довольно низкий. По данным R. Chakraborty и соавт. (1974), в среднем для негроидных, европеоидных и монголоидных популяций он составляет соответственно 3,68; 3,11 и 0 (приведенные цифры учитывают исследование только двух антигенов системы Лютеран — Lu^a и Lu^b).

Глава 7
СИСТЕМА ДАФФИ

M. Cutbush и P. L. Mollison (1950) нашли у одной пациентки с группой крови 0MNSrrPkLe(a—b—) необычное антитело, не имеющее отношение ни к одному из к тому времени известных групповых антигенов изосерологических систем AB0, MNSs, Rh, P, K и Lu. Позднее антитело с подобной специфичностью было обнаружено и другими исследователями. По фамилии женщины Даффи, у которой впервые выявили подобные антитела, его обозначили анти-Duffy, или анти-Fy^a, а сам антигенный рецептор, с которым оно реагировало, — антигеном Fy^a (по Wiener — антиген F). Антитела анти-Fy^a неполные и реагируют только в антиглобулиновой пробе Кумбса. Ферментные тесты, с помощью которых выявилась специфичная серологическая направленность многих неполных антител ко многим групповым антигенам крови, в данном случае оказались непригодными, поскольку протеолитические ферменты разрушают антигены системы Даффи. M. Cutbush и P. L. Mollison (1950) показали, что антиген Fy^a онтогенетически формируется рано, он легко выявлялся у эмбрионов и плодов. Антигенная выраженность Fy^a значительно уступает таковой у антигена K системы Келл. E. W. Ikin и соавт. (1951) сообщили об обнаружении нового антитела с противоположной, чем у антитела анти-Fy^a, серологической специфичностью. Его обозначили анти-Fy^b, а антигенный рецептор, с которым оно реагировало, антигеном Fy^b (по Wiener — антиген f). В дальнейшем антисыворотки анти-Fy^b обнаружили и другие исследователи.

Распределение групповых антигенов системы Даффи в различных популяциях далеко не одинаковое. Например, частота встречаемости антигена Fy^a среди английского, немецкого и австрийского населения приблизительно одинакова и равна соответственно 65, 69 и 62%. В то же время среди китайцев, австралийских аборигенов и эскимосов эта величина составляет 100%, а в негроидных популяциях — лишь 10—26%. Данных о частоте встречаемости антигена Fy^b среди различных народов гораздо меньше. Однако и по имеющимся сведениям антиген Fy^b является, во-первых, более распространенным антигеном, чем антиген Fy^a (частота его встречаемости у европеоидов составляет 82%), и, во-вторых, частота его распределения среди населения Земного шара подвержена значительным колебаниям меньше, чем антигена Fy^a.

Система Даффи длительное время считалась простой двуаллельной кодоминантной генетической системой с тремя возможными фенотипическими комбинациями: Fy(a+b—) при гомозиготном генотипе Fy^a/Fy^a, Fy(a—b+) при гомозиготном генотипе Fy^b/Fy^b и Fy(a+b+) при гетерозиготном генотипе Fy^a/Fy^b. O. Vetter и H. Wegner (1967) приводят данные о частоте встречаемости трех фенотипов системы Даффи среди 155 обследованных жителей Лейпцига: фенотип Fy(a+b—) встретился в 16,1%, фенотип Fy(a+b+) — в 49,7%, фенотип Fy(a—b+) — в 34,2% случаев. R. Sanger и соавт. (1955), исследуя многочисленные образцы крови негров, установили, что система Даффи не является, по-видимому, простой двуаллельной генетической системой, поскольку приблизительно 68% исследованных образцов имели весьма необычный фенотип Fy(a—b—). Это свидетельствовало в пользу наличия в этой системе не только аллелей Fy^a и Fy^b, но и какого-то тормозного аллеля, обозначенного Fy. Проведенные в дальнейшем обширные семейные исследования групповых антигенов системы Даффи не исключали возможности существования в этой генетической системе каких-то новых аллелей.

Многие исследователи допускают существование тормозного аллеля Fy и у представителей европеоидной расы. По данным R. R. Race и R. Sanger (1962), частота его встречаемости составляет 3%. H. Ritter (1967) впервые обнаружил среди белого населения гомозиготу Fy/Fy, фенотипически проявлявшуюся как Fy(a—b—). Автор

попытался вычислить частоту встречаемости тормозного аллеля *Fy* среди белого населения по силе антигенной выраженности Fy^a и Fy^b в фенотипах Fy(a+b—) и Fy(a—b+). Для населения Эссена (ФРГ) эта величина составила: Fy^a 42,51%; Fy^b 55,82%; Fy 1,67%. Это означает, что среди европейцев, имеющих, казалось бы, гомозиготные фенотипы Fy(a+b—) или Fy(a—b+), приблизительно 5—6% людей их не имеют, т. е. их генотипическая характеристика по системе Даффи не Fy^a/Fy^a или Fy^b/Fy^b, а Fy^a/Fy или Fy^b/Fy. Важность этого для судебно-медицинских экспертов, использующих антигены системы Даффи в качестве генетических маркеров, очевидна. Действительно, если эксперт не знает о существовании тормозного аллеля *Fy* в системе Даффи, то он, естественно, не учитывает и возможность его наличия у ребенка, матери или ответчика. Это может привести к ошибочному исключению отцовства или материнства при кажущейся противоположной гомозиготности ребенка и предполагаемого отца или ребенка и его матери.

Исследования M. Smerling (1975) со всей очевидностью подтвердили большую опасность ложного исключения отцовства или материнства по системе Даффи, если при этом не учитывается выраженность антигенов Fy^a и Fy^b, по которой все же можно определить, является ли конкретное лицо истинной гомозиготой (Fy^a/Fy^a или Fy^b/Fy^b) или же гетерозиготой (Fy^a/Fy или Fy^b/Fy).

B. Chown и соавт. (1965) обнаружили новый аллель в системе Даффи Fy^x, обусловливающий появление в эритроцитах слабого антигена Fy^b. Поэтому не исключено, что в семейных обследованиях иногда выявляемый генотип Fy^b/Fy был в действительности Fy^b/Fy^x. M. Lewis и соавт. (1972) вычислил частоту встречаемости генов Fy^a и Fy^b, она составила соответственно 42,4 и 56,0%. Для генов Fy^x и *Fy* она равна соответственно 1,5 и 0,1%.

J. A. Albrey и соавт. (1971) обнаружили в сыворотке крови одной белой женщины с редким для европеоидной популяции фенотипом Fy(a—b—) антитело, названное анти-Fy^3. Оно реагировало со всеми эритроцитами Fy(a+b—), Fy(a—b+) и Fy(a+b+), но не реагировало с эритроцитами Fy(a—b—). В отличие от обычных сывороток анти-Fy^a и анти-Fy^b, действие которых не усиливается при папаинизации испытуемых эритроцитов, антитело анти-Fy^3 резко активизировалось при проведении этого ферментного теста. Авторы предполагают, что суб-

станция Fy^3, с которой реагирует антитело анти-Fy^3, является веществом-предшественником для антигенов Fy^a и Fy^b.

O. Benzad и соавт. (1973) описали еще одно антитело, названное анти-Fy^4, которое реагировало со всеми эритроцитами Fy(a—b—) негритянского населения, но не реагировало с эритроцитами Fy(a+b+). На основании такого характера реакции можно предположить, что это антитело взаимодействует с генетическим продуктом либо супрессорного аллеля *Fy*, либо аллеля Fy^3.

Система Даффи широко применяется в экспертизах спорного отцовства, поскольку благодаря высокой частоте встречаемости аллелей Fy^a и Fy^b вероятность исключения отцовства, особенно среди европеоидов, весьма высока. По данным R. Chakraborty и соавт. (1974), вероятность исключения по этой системе для европеоидов, монголоидов и негроидов составляет в среднем 18,44, 11,59 и 4,2% соответственно. Такая величина значительно превышает вероятность исключения по такой, казалось бы, информативной системе, как АВО, даже с учетом ее подгрупп. По-видимому, единственную опасность для эксперта, использующего систему Даффи в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства, представляет возможная генотипическая гетерозиготность проходящих по делу лиц (Fy^a/Fy или Fy^b/Fy). Ее легко принять (если не учитывать силу выраженности агглютинации испытуемых эритроцитов с соответствующими сыворотками анти-Fy^a или анти-Fy^b) за генотипическую гомозиготность Fy^a/Fy^a или Fy^b/Fy^b. При экспертизе крови представителей европеоидной популяции опасность встречи тормозного аллеля *Fy* и аллеля Fy^x невелика, поскольку процент встречаемости их составляет соответственно 0,1 и 1,5 [Spielmann W. с соавт., 1968; Lewis M. с соавт., 1972]. У негроидной популяции эта величина значительно выше, что нужно учитывать при судебно-медицинской экспертизе спорного происхождения детей.

Глава 8
СИСТЕМА КИДД

F. H. Allen и соавт. (1951) обнаружили у женщины по фамилии Кидд новое необычное антитело. Эта женщина родила ребенка с гемолитической болезнью новорожден-

ных, и необычные антитела, найденные в сыворотке ее крови, безусловно, являлись причиной заболевания ребенка. Антитела подобной специфичности найдены L. Hunter и соавт. (1951) и несколько позднее другими исследователями.

Антиген, открываемый этими антителами, обнаруживается в крови людей, принадлежащих к европеоидным популяциям, приблизительно в 75% случаев, причем он не был сцеплен с другими генетически обусловленными системами крови (AB0, NNSs, Rh, P, Келл, Лютеран, Даффи), а также с системой выделительства. У негров частота встречаемости этого антигена составляет около 90%, в монголоидных популяциях она колеблется в пределах 50—100%.

Новый антиген был обозначен Jk^a, антитело, его открывающее, — анти-Jk^a. Лица, в крови которых имелся этот антиген, были обозначены Jk (a+), а в крови которых он отсутствовал Jk (a—). G. Plaut и соавт. (1953) нашли в сыворотке крови больной после неоднократных гемотрансфузий новое антитело с серологической специфичностью, противоположной таковой у антитела анти-Jk^a, которое было обозначено анти-Jk^b. R. Sanger и соавт. (1953) открыли подобное антитело, которое было сцеплено с антителом анти-s. Последующие исследования показали, что строго специфичные моновалентные сыворотки анти-Jk^b чрезвычайно редки, поскольку большинство найденных впоследствии сывороток анти-Jk^b являлись смесью антител с различной специфичностью. Антитела анти-Jk^b также могут явиться причиной гемолитической болезни новорожденного. Таким образом, изосерологическая система Кидд в настоящее время представляется аутосомальной двуаллельной кодоминантной генетической системой с тремя возможными генотипическими комбинациями: Jk^a/Jk^a [фенотип Jk(a+b—)], Jk^a/Jk^b [фенотип Jk(a+b+)] и Jk^b/Jk^b [фенотип Jk(a—b+)]. Результаты семейных обследований отчетливо подтвердили кодоминантный порядок наследования антигенов системы Кидд, поскольку во всех изученных «критических» родительских парах, когда оба родителя были Jk(a—) и Jk(a—) или Jk(b—) и Jk(b—), рождались дети соответственно Jk(a—) и Jk(b—).

Исключительно благоприятная частота встречаемости аллелей Jk^a и Jk^b, контролирующих полиморфизм системы Кидд, определяет довольно высокую информативность

этой системы в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей. По данным W. Spielmann и соавт. (1966), частота генов Jk^a и Jk^b для среднеевропейских народов составляет соответственно 50,5 и 49,5%. Такая величина определяет высокую вероятность исключения отцовства по системе Кидд. Для трех расовых групп, европеоидной, монголоидной и негроидной, этот показатель составляет соответственно 18,69, 15,73 и 15,45%.

Антигены системы Кидд онтогенетически формируются рано, они выявляются у плода и к моменту рождения ребенка выражены отчетливо. Это обстоятельство позволяет использовать данную систему в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства при ранних сроках жизни ребенка, что имеет практическое значение, поскольку подавляющее число подобных экспертиз проводится именно в это время.

F. G. Pinkerton и соавт. (1959) обнаружили необычный фенотип системы Кидд Jk(a—b—), причем в данном случае в сыворотке крови присутствовали антитела анти-Jk^b и необычное антитело анти-Jk^aJk^b. Это антитело не являлось смесью обычных антител анти-Jk^a и анти-Jk^b, поскольку его специфичность не изменялась в результате абсорбции соответствующими эритроцитами. В дальнейшем этот редкий фенотип системы Кидд был найден также и другими исследователями. Все лица, имеющие этот фенотип, относились к монголоидной расе. Среди лиц европеоидной и негроидной рас фенотип Jk(a—b—) пока не обнаружен.

M. Hulten и соавт. (1966) показали, что генный локус системы Кидд может располагаться либо на хромосоме 2, либо на одной из хромосом группы 6—12.

Глава 9

СИСТЕМА Xg

Открытие группового признака Xg^a, входящего в систему Xg, вызвало настоящую сенсацию. Все ранее известные генетически обусловленные системы крови человека характеризуются аутосомальным порядком наследования, т. е. генные локусы всех этих систем находятся на тех или иных хромосомах, за исключением половых хромосом *X* или *Y* (на аутосомах или аутосомальных хромосо-

мах). Генный же локус системы Xg, как показали первые семейные обследования, располагается не на аутосомальных хромосомах, несущих на себе генные локусы всех изосерологических, сывороточных и ферментных систем крови человека, а на женской половой хромосоме *X*.

Система Xg была открыта J. D. Mann и соавт. (1962), которые обнаружили в крови 50-летнего англичанина, страдавшего тяжелой формой наследственного капиллятоксикоза и перенесшего по этому поводу большое число гемотрансфузий, новое антитело с неизвестной ранее серологической направленностью. Это антитело обозначили анти-Xg^a, а антиген, с которым оно взаимодействовало, — Xg^a и ген, контролирующий появление этого признака, — Xg^a. Авторы предположили, что в этой системе существует и другой тормозной аллель — *Xg*. Все люди по этой системе подразделялись на два возможных фенотипа: Xg(a+), в эритроцитах которых есть антиген Xg^a, и Xg(a—), в эритроцитах которых этот антиген отсутствует. Позднее антитела анти-Xg^a обнаружили и другие исследователи.

Тесное сцепление системы Xg с женской половой хромосомой *X* было выявлено после исследования большого числа образцов крови не связанных родством англичан (корреляция была статистически достоверной). По результатам исследования вычисленная процентная частота встречаемости генотипов системы Xg среди английского населения следующая:

Мужчины		*Женщины*	
Xg^a/Y	0,6169	Xg^a/Xg^a	0,3806
Xg/Y	0,3831	Xg^a/Xg	0,4726
		Xg/Xg	0,1468

H. Cavin и соавт. (1963) приводят данные о частоте встречаемости фенотипов Xg(a+) и Xg(a—) среди белых жителей Нью-Йорка (1550 обследований) и негроидных популяций США и Ямайки (219 обследований) (табл. 11).

Из табл. 11 видно, что антиген Xg^a в европеоидной популяции встречается чаще, чем в негроидной. По данным R. Simmons (1970), наивысшая частота встречаемости этого антигена приходится на коренных жителей Новой Гвинеи (85%) и Австралии (79%), причем процентные величины отражают общее число носителей Xg^a среди мужского и женского населения.

Таблица 11

Частота встречаемости фенотипов Xg(a+) и Xg(a—) среди белого населения (А) и негроидных популяций (Б)

Фенотип	А		Б	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
Xg(a+)	64,8%	89,4%	54,6%	80,0%
Xg(a—)	35,2%	10,6%	45,4%	20,0%

Поскольку ген Xg^a располагается на женской половой хромосоме X, то от мужчины, имеющего фенотип Xg(a+), не могут родиться девочки с фенотипом Xg(a—), а у женщины с фенотипом Xg(a—) не могут родиться мальчики с фенотипом Xg(a+). Это правило, естественно, не относится к аномалиям половых хромосом и, в частности, синдрому Тернера (кариотип: 45 хромосом — 44 аутосомы + X, половой хроматин отсутствует) и синдрому Клайнфелтера (кариотип: 47 хромосом — 44 аутосомы + XXY, половой хроматин присутствует). Необходимо, правда, отметить, что для диагностики этих заболеваний, так же как и при других хромосомных аберрациях, можно использовать так называемый эффект дозы, который «улавливают» многие сыворотки анти-Xg^a.

Установлено, что с антителами анти-Xg^a эритроциты крови гемизиготного типа Xg^a/Y взаимодействуют значительно сильнее, чем гетерозиготного типа Xg^a/Xg. В то же время степень агглютинации эритроцитов крови гемизигот Xg^a/Y при взаимодействии их с сыворотками анти-Xg^a равна таковой у эритроцитов крови гомозигот Xg^a/Xg^a.

В табл. 12 приведены данные о наследственной передаче групповых антигенов системы Xg в 50 семьях. Эти данные отчетливо демонстрируют исключительную ценность этой системы для судебно-медицинской экспертизы спорного происхождения детей.

Действительно, система Xg открывает принципиально новые возможности в решении вопроса о спорном происхождении ребенка. Помимо информации о групповых антигенах, она дает эксперту возможность решить, от кого из родителей ребенок (в зависимости от его пола) унаследовал половую хромосому X, несущую или же не не-

Таблица 12

Фенотипы Xg у членов 50 белых семей со 104 детьми
(*по Mann J. и соавт., 1962*)

Отец	Мать	Число родительских пар	Общее число детей	Число детей			
				мальчики		девочки	
				Xg (a+)	Xg (a—)	Xg (a+)	Xg (a—)
Xg(a+)	Xg(a+)	30	64	23	12	29	0
Xg(a+)	Xg(a—)	3	7	0	3	4	0
Xg(a—)	Xg(a+)	16	30	9	4	10	7
Xg(a—)	Xg(a—)	1	3	0	2	0	1

сущую на себе аллель, контролирующий образование антигена Xg^a. Например, если у Xg (—)-женщины имеется Xg(+)-дочь, то эксперт может легко заключить, что отцом такой дочери может быть только мужчина, имеющий этот антиген, поскольку набор половых хромосом у дочери *XX*, при этом одну половую хромосому *X*, не несущую на себе аллель Xg^a, она унаследовала от матери, а вторую с аллелем Xg^a — от отца. Следовательно, в таком браке девочки всегда будут иметь группу крови Xg(a+). Если же у отца группа крови Xg(a+), а у матери Xg(a—), то мальчики в таком браке всегда будут иметь группу Xg(a—), поскольку набор их половых хромосом *XY*, при этом хромосома *Y* наследуется только от отца, а хромосома *X* без аллеля Xg^a — от матери. Другими словами, если мать в таком браке не имеет антигена Xg^a, то ее сыновья не могут получить по наследству этот антиген.

Несмотря на то что система Xg является двуаллельной, а следовательно, недостаточно полиморфной эритроцитарной системой, ее информативность при решении вопроса о спорном происхождении ребенка велика. Это связано с тем, что судебно-медицинский эксперт, имеющий в своем распоряжении сыворотку анти-Xg^a, по характеру ее взаимодействия с испытуемыми эритроцитами может легко установить любой из пяти возможных нормальных генотипических наборов половых хромосом у человека (Xg^a/Xg^a, Xg^a/Xg, Xg/Xg, Xg^a/Y, Xg/Y) и в зависимости от этого решать вопрос о возможности или невозможности рождения сына или дочери от конкретной родительской пары.

Раздел II
СЫВОРОТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ

Глава 10
СИСТЕМА ГАПТОГЛОБИНА

Сывороточный белок гаптоглобин (Hp) был открыт в 1938 г. M. Polonowski и M. F. Jayle. O. Smithies (1955) доказал существование трех типов Hp, а в том же году O. Smithies и R. H. Walker на основании посемейных обследований доказали и их генетическую обусловленность. Авторы предложили генетическую модель наследования трех типов Hp, согласно которой два аутосомальных кодоминантных аллеля Hp^1 и Hp^2 в едином генном локусе *Hp* контролируют появление трех фенотипов Hp: Hp1-1, Hp2-1 и Hp2-2. Фенотипы Hp1-1 и Hp2-2 генотипически гомозиготны по соответствующим аллелям (Hp^1/Hp^1 и Hp^2/Hp^2), а фенотип Hp2-1 генотипически гетерозиготен (Hp^1/Hp^2).

Многочисленные семейные обследования, проведенные в ряде стран среди различного в расовом отношении населения, в основном подтвердили правильность этой генетической гипотезы. Однако в настоящее время накопилось много новых данных и наблюдений, требующих создания новой формально генетической модели наследования групп гаптоглобина.

Гаптоглобин является α_2-гликопротеином, в норме в крови содержится около 10 г/л, он составляет приблизительно 25—30% всей α_2-протеиновой фракции и 1—2% всех сывороточных белков, причем нормальная концентрация этого белка может значительно колебаться. Для судебных медиков существенным является то, что при обычной электрофоретической технике определения типов гаптоглобина в крахмальном геле можно четко определить типы этого белка только в том случае, если его уровень в сыворотке составляет не менее 4 г/л. При концентрации 1,5 г/л и ниже определение типов гаптоглобина вообще едва ли возможно. Во всех этих случаях возникает

большая опасность для экспертов — можно неправильно диагностировать истинную генетически обусловленную агаптоглобинемию. Количественное определение гаптоглобина в сыворотке свидетельствует о том, что при типе Hp2-2 его содержание почти всегда ниже, чем в сыворотке лиц с типом Hp1-1. Судебно-медицинский эксперт всегда должен четко представлять, что приблизительно у 90% новорожденных в сыворотке крови гаптоглобина нет (так называемая физиологическая агаптоглобинемия), однако в 3—4-месячном возрасте тип этого белка, как правило, уже можно установить.

G. E. Connell и соавт. (1962) при редуцированном расщеплении очищенного гаптоглобина меркаптоэтанолом в присутствии 8 М мочевины выделили две молекулярные цепи — α и β. Авторы смогли доказать, что β-цепь не является генетически вариабельной, хотя она ответственна за образование гаптоглобина, а α-цепь генетически вариабельна и в зависимости от действия того или иного аллеля (Hp^1 или Hp^2) трансформируется соответственно в α_1- или α_2-цепь.

Белок Hp1 при обычном электрофорезе в крахмальном геле мигрирует к аноду как один компонент, обладающий высокой электрофоретической подвижностью. Белки Hp2-1 и Hp2 образуют несколько зон с различной скоростью миграции (рис. 5). A. C. Allison (1959) объясняет это тем, что белки Hp2 могут полимеризоваться.

В настоящее время установлено, что генный локус Hp_α, контролирующий весь полиморфизм системы Hp, располагается на хромосоме 16.

Методики определения типов гаптоглобина. Качественное определение типов гаптоглобина в основном проводят с помощью электрофореза в крахмальном геле.

При применении методики, разработанной O. Prokop и G. Bundschuh (1963), используют щелочную боратную систему. Готовят гелевый буфер: 4,63 г H_3BO_3 и 3,33 г NaOH на 5 л дистиллированной воды, pH 11. Перед непосредственным употреблением основной раствор разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 1. Готовят электродный (переходный) буфер: 37,2 г H_3BO_3 и 4,8 г NaOH на 2 л дистиллированной воды.

При электрофорезе с прерывистой буферной системой по M. Poulik (1957) используют трис-цитратный буфер. Состав буферной системы следующий. Гелевый буфер: 0,076 М трис, 0,005 М лимонная кислота, pH 8,6; элек-

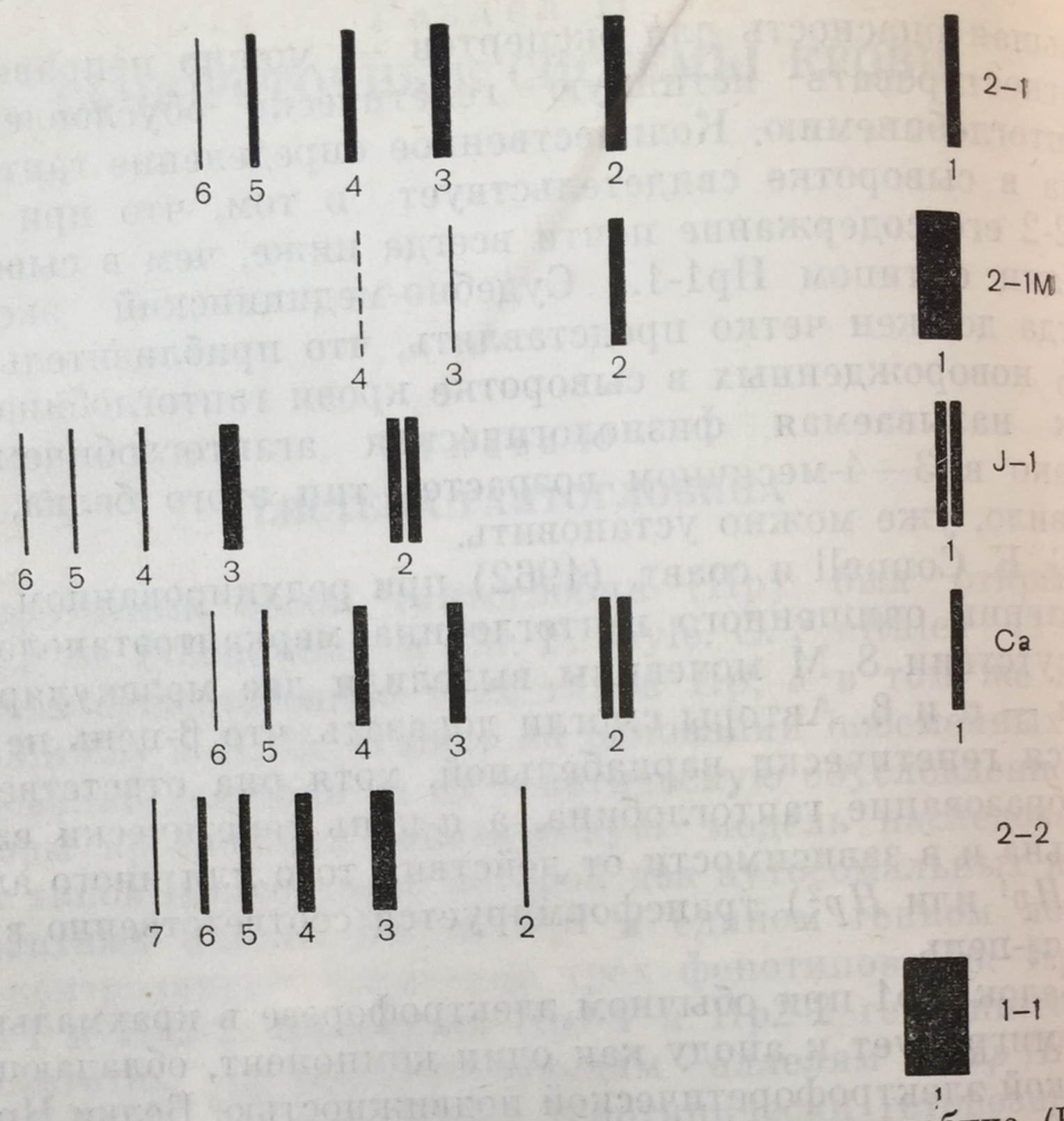


Рис. 5. Фореграммы трех стандартных типов гаптоглобина (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2) и трех атипичных его вариантов (Hp2-1M, HpJ-1 и HpCa), выявляемых с помощью электрофореза в крахмальном геле. Цифрами 1—7 обозначены соответствующие фракции Hp.

тродный буфер: 0,3 M H_3BO_3, 0,06 M NaOH, pH 8,6. С помощью этой системы достигается значительно лучшее разделение фракций гаптоглобина, поэтому ее всегда следует применять для изучения редких вариантов белка, а также во всех случаях, когда у эксперта возникают сомнения в отношении типа гаптоглобина. К недостаткам этого метода следует отнести невозможность использования «многорядных» крахмальных блоков, поскольку при указанной величине pH гелевого буфера различные сывороточные белки мигрируют в направлении как анода, так и катода.

Для определения типов гаптоглобина используют также электрофорез на бумаге, агаровом геле, в геле полиакриламида.

Генетические концепции наследования типов гаптоглобина. Несмотря на то что начиная с 1959 г. в генном ло-

кусе системы Hp были с достоверностью открыты новые аллели, для практического использования этой системы в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей до самого последнего времени было достаточно трех ее основных стандартных фенотипов (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2). Их появление обусловлено действием аллелей Hp^1 и Hp^2 согласно первоначально предложенной O. Smithies и R. Walker (1956) двуаллельной модели наследования групп гаптоглобина. Дело в том, что среди белого европеоидного населения частота встречаемости всех атипичных вариантов гаптоглобина, обусловленных действием новых аллелей в генном локусе системы гаптоглобина, благодаря их крайней редкости чрезвычайно мала и в какой-то степени ею можно пренебречь. Большинство таких вариантов можно выявить с помощью обычного электрофоретического разделения. Гораздо труднее обнаружить редкий аллель Hp^0 в гетерозиготной форме с одним из основных аллелей Hp^1 или Hp^2. Частота встречаемости аллелей Hp^1 и Hp^2 среди европеоидов, монголоидов и негроидов составляет соответственно 35—65, 20—80 и 45—55%.

Благоприятная в плане информативности частота встречаемости основных аллелей Hp^1 и Hp^2 среди населения Земного шара делает эту систему Hp особенно ценной при использовании ее в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства. Вероятность исключения мужчины, не являющегося биологическим отцом ребенка и фигурирующего в процессе в качестве ответчика, при использовании только одной системы Hp составляет для европеоидных популяций 18% [Prokop O., Göhler W., 1976], негроидных и монголоидных популяций соответственно 18,73 и 15,96% [Chakruborty R. и соавт., 1974]. G. E. Connell и соавт. (1962) доказали, что α_1-гаптоглобиновая фракция неоднородна. Авторы установили подтипы в двуаллельной модели. С помощью вертикального электрофореза в мочевинно-крахмальном геле авторы смогли показать существование двух α_1-цепей гаптоглобина: $Hp1F_\alpha$ (быстромигрирующая) и $Hp1S_\alpha$ (медленно мигрирующая). Посемейные обследования, проведенные этими исследователями, свидетельствовали о том, что появление двух различных полипептидных цепей Hp обусловлено действием двух различных аллелей Hp^{1F} и Hp^{2S} в аутосомальном кодоминантном генном локусе системы Hp. Полипептидные цепи $Hp1F_\alpha$ и $Hp1S_\alpha$ различались лишь по набору аминокислот.

На основании проведенных исследований была предложена новая трехаллельная генетическая модель наследования типов гаптоглобина:

Аллели Hp^{1F}, Hp^{1S}, Hp^{2}.
Генотипы Hp^{1F}/Hp^{1F}, Hp^{1S}/Hp^{1S}, $Hp^{1F}/^{1S}$, $Hp^{1F}/^{2}$, Hp^{1S}/Hp^{2}, Hp^{2}/Hp^{2}.
Фенотипы Hp1F-Hp1F, Hp1S-Hp1S, Hp1F-Hp1S, Hp2-1F, Hp2-1S, Hp2-2.

По современной теории наследования групп гаптоглобина в аутосомальном кодоминантном генном локусе системы Hp из-за частичной генной дубликации в результате негомологичного перекреста хромосом существует по меньшей мере пять «стандартных» аллелей: Hp^{1F}, Hp^{1S}, Hp^{2FF}, Hp^{2SS}, Hp^{2} (или $Hp^{2(FS)}$ для Hp^{2FS} и Hp^{2SF}), обусловливающих появление не менее 15 генотипических комбинаций, антигенно реализующихся появлением 15 различных фенотипов этой системы:

1. Hp1F-1F (Hp^{1F}/Hp^{1F})
2. Hp1F-1S (Hp^{1F}/Hp^{1S})
3. Hp2FF-1F (Hp^{1F}/Hp^{2FF})
4. Hp2SS-1F (Hp^{1F}/Hp^{2S})
5. Hp2FS-1F (Hp^{1F}/Hp^{2FS})
6. Hp1S-1S (Hp^{1S}/Hp^{1S})
7. Hp2FF-1S (Hp^{1S}/Hp^{2FF})
8. Hp2SS-1S (Hp^{1S}/Hp^{2SS})
9. Hp2FS-1S (Hp^{1S}/Hp^{2FS})
10. Hp2FF-2FF (Hp^{2FF}/Hp^{2FF})
11. Hp2FF-2SS (Hp^{2FF}/Hp^{2SS})
12. Hp2FF-2FS (Hp^{2FF}/Hp^{2FS})
13. Hp2SS-2SS (Hp^{2SS}/Hp^{2SS})
14. Hp2SS-2FS (Hp^{2SS}/Hp^{2FS})
15. Hp2-2 или Hp2FS-2FS [$Hp^{2(FS)}/Hp^{2(FS)}$]

Частота встречаемости аллелей Hp^{1F} и Hp^{1S} среди европейского населения примерно одинакова и составляет 15—20%.

Агаптоглобинемия. Впервые доказательства в пользу существования генетически обусловленной агаптоглобинемии у человека представили H. Harris и соавт. (1958). Они сообщили о двух белых семьях, у членов которых довольно часто наблюдался фенотип Hp0 и была отмечена несовместимость пар мать — ребенок. Эти наблюдения авторы объяснили тем, что в этих семьях либо имеется аллель Hp^{0}, либо передается по наследству какой-то измененный или супрессорный ген, тормозящий синтез гаптоглобина. Еще более удивительные данные представили E. Matsunaga и соавт. (1970). Они описали японскую семью, в трех поколениях которой один раз наблюдалась несовместимость по типам Hp (противоположная гомозиготность) у матери и ребенка и два раза — такая же несовместимость по типам Hp у ребенка и отца. Перепуты-

вание детей при рождении, а также их «незаконнорожденность» в обоих случаях полностью исключались на основании других обширных генетических исследований. Объясняя этот феномен, авторы также выдвинули гипотезу о наличии аллеля Hp^0, который в паре с аллелем Hp^1 давал не полностью совпадающую картину фенотипа Hp1-1, а в паре с аллелем Hp^2 — нормальный или резко ослабленный фенотип Hp2-2.

О подобных находках противоположной *Hp*-гомозиготности между родителем и ребенком, когда их «родство» не вызывало никакого сомнения, сообщали и другие авторы.

Эти обстоятельства постоянно должен учитывать судебно-медицинский эксперт при исключении отцовства (материнства) по противоположной *Hp*-гомозиготности. Действительно, если отец ребенка имеет генотип Hp^0/Hp^1, мать — Hp^2/Hp^2, а ребенок — Hp^2/Hp^0, то в данном случае возможность сделать ошибочное исключение отцовства чрезвычайно велика, поскольку гетерозиготные генотипы отца и его ребенка ошибочно трактуются как противоположно гомозиготные. Поэтому во всех случаях исключения отцовства по противоположной Hp-гомозиготности эксперт обязан:

— провести возможно максимальное исследование генетических маркеров других изосерологических, сывороточных и ферментных систем с целью подтверждения невозможности ответчика быть отцом ребенка;

— в случае «неисключения» отцовства по всем другим исследованным серологическим признакам исследовать кровь ответчика на наличие типов Hp. Например, исключение ответчика по противоположной *Hp*-гомозиготности. Ответчик имеет фенотип Hp1-1, мать и ребенок — Hp2-2. Для предотвращения ошибочного исключения отцовства (генотипы ответчика, матери и ее ребенка соответственно Hp^0/Hp^1, Hp^2/Hp^2 и Hp^0/Hp^2) исследуют типы Hp родителей ответчика. Если оба родителя имеют тип Hp2-1, то эксперт должен исключить ответчика в качестве отца ребенка;

— провести повторное исследование крови ответчика, матери и ее ребенка на наличие типов Hp с обязательным включением контрольных образцов Hp1-1 и Hp2-2. При этом необходимо учитывать малейшее отклонение гаптоглобиновых фракций «контрольного» Hp1-1 и Hp1-1 ответчика и ребенка, а также интенсивность выраженно-

сти гаптоглобиновых фракций (особенно в Hp2-2) в контрольных и исследуемых образцах крови.

Среди европеоидных популяций случаи истинной генетически обусловленной агаптоглобулинемии (Ahp) чрезвычайно редки, поэтому вероятность ее обнаружения при проведении экспертиз в делах о спорном происхождении детей также мала. Гораздо чаще истинная Ahp или фенотип Hp0 наблюдается у негров, особенно в семьях, члены которых имеют особый вариант Hp — так называемый модифицированный Hp2-1, или Hp2-1 mod, или Hp2-1M.

Редкие атипичные типы гаптоглобина. К ним относят фенотипы Hp2-1M, HpJ-1 (Johnson) и другие.

Фенотип Hp2-1M. E. R. Giblett (1959) описала у негроидной популяции необычный фенотип Hp, который благодаря близости величины электрофоретической подвижности к таковой стандартного Hp2-1 был назван Hp2-1 mod, или Hp2-1M. Этот тип (см. рис. 5) характеризуется интенсивными двумя первыми быстро мигрирующими Hp-фракциями (фракции 1 и 2) и значительно менее интенсивными и медленно мигрирующими Hp-фракциями. Число последних у Hp2-1M меньше, чем у Hp2-1. По выраженности медленных Hp-фракций тип Hp2-1M очень трудно отличить от «нормального» типа Hp2-1. Результаты многочисленных семейных обследований свидетельствуют о генетической обусловленности типа Hp2-1M и его наследственной передаче.

Тип Hp2-1M чрезвычайно редок среди европеоидов, до настоящего времени описаны только три белые семьи, для которых была доказана наследственная передача типа Hp2-1M. Среди неевропеоидных популяций, особенно среди негров, тип Hp2-1M распространен довольно широко.

Фенотип HpJ-1 (Johnson) впервые был описан E. R. Giblett (1959) у негритянской женщины и ее дочери. Затем этот фенотип наблюдали в различных расах и популяциях, несмотря на то что он встречается довольно редко. При электрофорезе в крахмальном геле HpJ-1 (Johnson) разделяется на хорошо выраженную фракцию 1, фракции 2—6 сдвинуты к катоду (уменьшение скорости миграции этих фракций совершенно такое же, как и при разделении Hp2-1) и фракции 1 и 2 разделяются на два компонента (см. рис. 5). Иногда наблюдается появление добавочных фракций, отсутствующих при электрофорезе Hp1-1, Hp2-2, Hp2-1 и Hp2-1M.

Тип Johnson не является модификацией типа Hp2-1 (как рассматривали его ранее, прежнее название Hp2-1J). Исследование диссоциированных α-цепей показало, что этот тип, очевидно, обязан своим происхождением аллелям Hp^{J} и Hp^{1S}. O. Smithies и соавт. (1962) предположили, что причиной появления аллеля Hp^{J} явилась генная трипликация посредством кроссинговера между двумя Hp^{2}-генами при передвинутом синапсе. Поэтому на основании теории эволюционного развития аллелей Hp^{2} теоретически можно допустить возможность появления восьми вариантов гена Hp^{J}: $Hp^{J(FFF)}$, $Hp^{J(FFS)}$, $Hp^{J(FSF)}$, $Hp^{J(SFF)}$, $Hp^{J(SSS)}$, $Hp^{J(SSF)}$, $Hp^{J(SFS)}$ и $Hp^{J(FSS)}$.

Другие варианты гаптоглобина. F. Galatius-Jensen (1958) описал новый необычный фенотип гаптоглобина — Hp Carlsberg (Hp-Ca), который по интенсивности, числу и скорости миграции Hp-фракций почти не отличался от обычного фенотипа Hp2-1, однако его фракция 2 отчетливо расщеплялась (см. рис. 5). Позднее этот тип был описан другими авторами. Относительно высокая частота встречаемости Hp-Ca у членов одной семьи в различных поколениях свидетельствовала о генетической обусловленности этого типа.

Согласно исследованиям E. R. Giblett (1964), фенотип Hp-Ca характеризуется уменьшенной генетической реализацией (генетическим продуцированием) генпродукта *Hp1*.

W. C. Parker и A. G. Bearn (1963) выдвинули генетическую концепцию наследования типа Hp-Ca, согласно которой своим происхождением он обязан генному комплексу, состоящему из нормальных аллелей Hp^{1} и Hp^{2} и измененного (в результате неравномерного кроссинговера между генными локусами Hp^{1} и Hp^{2}) аллеля Hp^{2}.

О других вариантах гаптоглобина упомянем лишь вкратце.

Типы гаптоглобина Hp2-1 (trans) и Hp2-1 (Haw) характеризуются усиленной продукцией генпродукта *Hp1* в обычном гетерозиготном фенотипе Hp2-1. Их генетическая наследственная передача изучена еще недостаточно. Различают атипичные электрофоретические варианты гаптоглобина. 1. Фенотипы Hp модифицированный Johnson 1 и Johnson 2 (Hp mod. Johnson 1 и Hp mod. Johnson 2); 2. Фенотип Hp-Ab (Aborigen); 3. Фенотипы Hp1-P, Hp2-P, Hp1-H, Hp2-H и Hp-L.

Иммуногенетические варианты гаптоглобина. При изучении гаптоглобина с помощью иммунологических и иммуногенетических методов были открыты ранее неизвестные его свойства. Вначале считали, что все три обычных стандартных типа гаптоглобина (Hp-1, Hp2-1 и Hp2-2) иммунологически идентичны. Однако впоследствии были обнаружены различные антигенные детерминанты гаптоглобина. K. Eichmann и соавт. (1966) характеризовали их следующим образом. Антигенная детерминанта A обнаруживается во всех трех стандартных типах гаптоглобина и комплексе Hp — Hb. Антигенная детерминанта B выявляется во всех трех стандартных типах гаптоглобина, если они не связаны в комплекс с гемоглобином. Антигенная детерминанта C имеется в типах Hp2-2 и Hp2-1, но отсутствует в типе Hp1-1. В дальнейшем были выявлены дополнительные антигенные детерминанты гаптоглобина, которые независимо от комплекса Hp — Hb определяют, по-видимому, антигенный полиморфизм β-цепей гаптоглобина, до последнего времени считавшихся генетически мономорфными.

Интересно отметить, что существуют некоторые генетически обусловленные варианты гаптоглобина, которые могут быть выявлены не электрофоретическими, а только иммунологическими методами. К ним следует отнести варианты Hp Marburg и Hp Bellevne. Оба варианта имеют пониженное «сродство» к гемоглобину (сниженную Hb-связывающую способность) и являются мутантами β-цепей гаптоглобина.

Итак, сывороточная система гаптоглобина, как и многие генетически обусловленные системы крови человека, является исключительно полиморфной, а следовательно, весьма ценной для судебно-медицинской экспертизы в делах о спорном происхождении ребенка. Даже с учетом двуаллельной модели наследования групп гаптоглобина процент исключения мужчин, ложно указанных в качестве отцов того или иного ребенка, из-за большой частоты встречаемости аллелей Hp^1 и Hp^2 достаточно высок. Дальнейшее совершенствование методов электрофоретического анализа и широкое внедрение их в экспертную практику в ближайшее время, несомненно, расширят судебно-медицинские возможности при использовании системы гаптоглобина в подобного рода экспертизах. Электрофоретическое выявление генетически обусловленной неоднородности фракций $Hp1\alpha^F$ и $Hp1\alpha^S$ позволит использовать уже не три,

а шесть возможных генотипических комбинаций гаптоглобина, по которым можно будет более конкретно судить о возможности или невозможности рождения ребенка от определенной родительской пары.

Глава 11
СИСТЕМЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

В области исследования групп крови человека едва ли найдутся две такие тесно связанные друг с другом специальности, как серо- и иммуногенетика. Оба научных направления, взаимно дополняя друг друга, в настоящее время переросли в единую научную систему, которая непрерывно совершенствуется; ее успехи широко используются в эволюционной генетике, клинической иммунологии и судебно-медицинской серологии. Поэтому без основных положений серологической и иммунологической генетики иммуноглобулинов не может обойтись ни один специалист перечисленных научных направлений.

Структура и классификация иммуноглобулинов (Ig). В основном Ig-молекула состоит из одной пары идентичных тяжелых (H-цепей) и одной пары идентичных легких (L-цепей) цепей, которые с помощью дисульфидных и нековалентной связей соединяются друг с другом (рис. 6).

L-цепи в среднем включают 214 аминокислотных остатков и имеют молекулярную массу около 23 000 дальтон. Половина этих цепей имеют постоянную первичную структуру (C-часть), а другая половина — вариабельную (V-часть). Такое непостоянство возникает в результате многих тысяч аминокислотных перестановок, обусловливающих антигенную направленность цепи и всей Ig-молекулы к строго специфичным антителам. По подобному же принципу построены и H-цепи. В отличие от L-цепей они почти в 2 раза длиннее и тяжелее и около $^3/_4$ длины H-цепи представляет собой C-часть. Вследствие этого V-части H- и L-цепей имеют почти одинаковую величину. Под действием ферментов Ig-молекула расщепляется на Fc- и Fab-фрагменты приблизительно на середине H-цепи или же на два Fab-фрагмента с половиной H-цепи и всей L-цепью, причем Fab-фрагмент, разделяющий H-цепь, называется Fd-частью.

Классификация иммуноглобулинов основана на трех формах гетерогенности этих белков: изотипы, аллотипы и

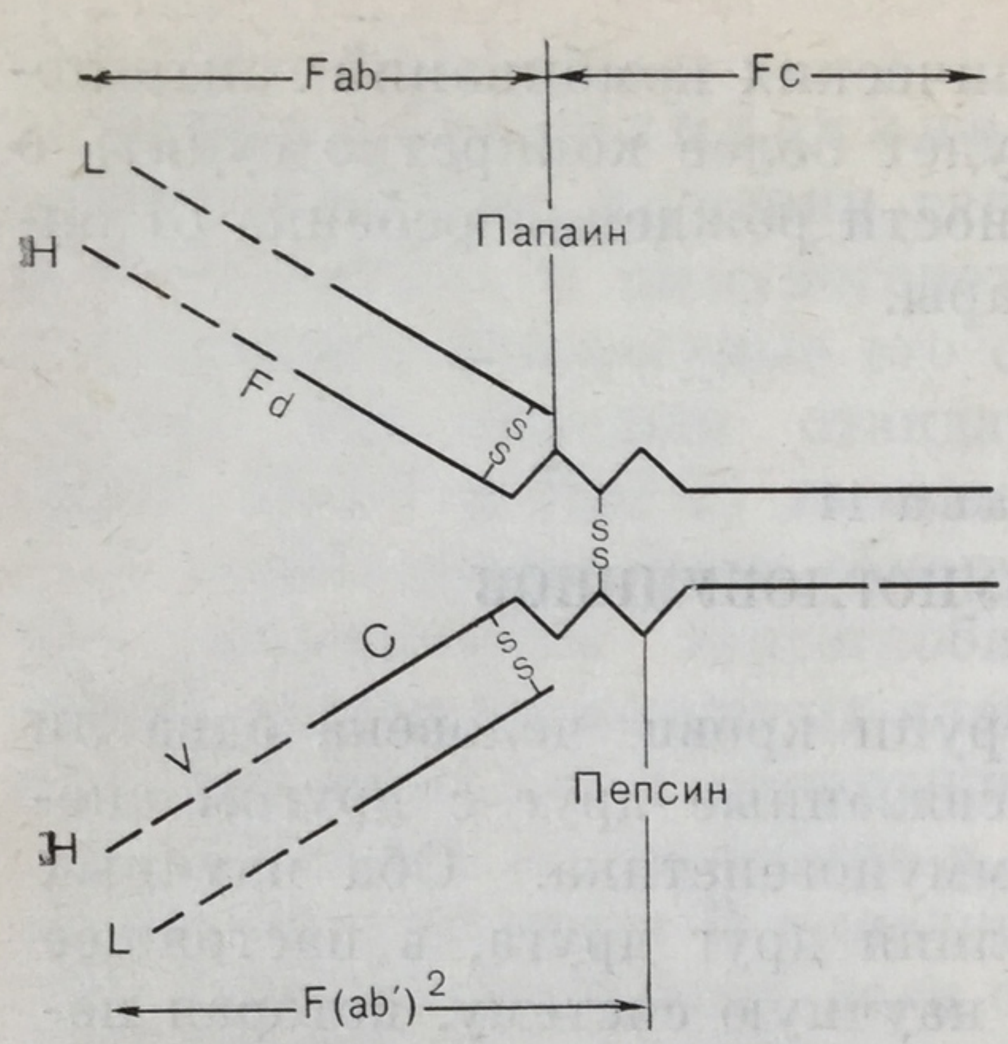


Рис. 6. Структурная модель молекулы IgG. Объяснение см. в тексте.

идиотипы. Изотипы — это различные варианты, которые в сыворотке крови каждого индивида представлены пятью классами и очень многими подклассами, причем все изотипические варианты у всех людей идентичны. Аллотипы являются генетическими иммуноглобулиновыми маркерами. При этом различные аллели обусловливают вариабельность первичной структуры цепей иммуноглобулинов. Таким образом, в данном случае речь идет уже о генетически обусловленном полиморфизме, поэтому каждый человек имеет лишь определенные структурные аллотипические варианты, которые он унаследовал от своих родителей. Различия между изо- и аллотипами проявляются и в другом. Так, если изотипы отличаются друг от друга по структурным компонентам общей С-части полипептидных цепей, позволяющим разделить их на 5 классов и множество подклассов, то аллотипы отличаются друг от друга лишь тончайшими различиями в первичной структуре С-частей полипептидных цепей, часто проявляющимися перестановкой в цепи одной или нескольких аминокислот. Из этого следует, что аллотипы чаще всего являются классо- и подклассоспецифичными.

В настоящее время у человека найдены четыре независимые друг от друга и всех других генетических маркеров крови генетические полиморфные иммуноглобулиновые системы.

1. Gm-система. Генетический маркер γ-цепей, поэтому полиморфизм системы проявляется только в гаммаиммуноглобулиновых (JgG) молекулах.
2. InV-система. Генетический маркер L-цепей H-типа, поэтому факторы системы InV обнаруживаются во всех Ig-молекулах, участвующих в «строительстве» H-цепей независимо от их класса и подкласса.
3. Фактор ISf. Генетический маркер γ_1-цепи, поэтому он выявляется только в IgG_1-молекулах.

4. Am-система. Генетический маркер α_2-цепей, поэтому факторы этой системы могут быть обнаружены только в IgA_2-молекулах.

Идиотипы характеризуются чрезвычайно многочисленными структурными вариантами в V-частях Ig-цепей. Они представляют собой биологически чрезвычайно важную гетерогенность иммуноглобулинов, поскольку определяют антигенную специфичность молекулы. Хотя число различных вариантов идиотипов у человека колеблется в пределах 10^5—10^7, для серологии групп крови идиотипы (так же как и изотипы) до сих пор не имеют никакого значения.

Методика определения факторов иммуноглобулиновых систем. Обнаружение факторов Ig-систем основано на реакции торможения, или задержки агглютинации.

M. V. Waller и J. H. Vaughan (1956), R. Grubb (1956) впервые показали, что $0Rh_0$-эритроциты, сенсибилизированные неполными антителами анти-Rh_0, могут агглютинироваться определенным ревматоидным фактором, содержащимся преимущественно в сыворотке крови больных ревматоидным артритом. R. Grubb (1956) установил также, что определенные сыворотки способны тормозить эту агглютинацию. R. Grubb и A. Laurell (1956) доказали, что это «тормозное» свойство генетически детерминированно, а так называемый «тормозной» фактор относится к гаммаглобулиновой фракции сыворотки, поэтому он был назван фактором Gm(a).

Для обнаружения факторов систем Gm и InV необходимы человеческие эритроциты человека группы $0Rh_0$; неполные антитела анти-$0Rh_0$; антитела анти-Gm или анти-InV; испытуемая нормальная сыворотка. Стандартная техника выявления иммуноглобулиновых факторов систем Gm и InV сводится к следующему. Свежевзятые (не более суток) человеческие эритроциты 3 раза отмывают изотоническим раствором NaCl. К 0,05 мл отмытого осадка эритроцитов для их сенсибилизации добавляют 0,06 мл анти-Rh_0 сыворотки определенной Gm-специфичности (при строгом соблюдении ее разведения). Инкубацию проводят в течение 90 мин при +37° С. После сенсибилизации эритроциты снова 3 раза отмывают изотоническим раствором NaCl, осадок растворяют в 1 мл изотонического раствора NaCl для получения 5% взвеси эритроцитов. Приготовляют около 1 мл сыворотки анти-Gm необходимого разведения (этого количества сыворотки до-

статочно для 100 исследований). Испытуемую нормальную сыворотку разводят изотоническим раствором NaCl до 1 : 10—1 : 20. На пластинку из плексигласа с дорожками микропипеткой наносят по одной капле сыворотки анти-Gm и испытуемой разведенной сыворотки и смешивают их осторожным покачиванием пластинки. Через 5 мин к смеси добавляют каплю сенсибилизированных эритроцитов. Пластинки помещают во влажную камеру при +4° С на 1—2 ч (время реакции и температурный режим зависят от исследуемых систем). Результаты реакции учитывают макроскопически, осторожно покачивая пластинки.

Описанный метод очень чувствительный. По данным Göhler (1966), с помощью сыворотки анти-Gm можно обнаружить 0,0004 мг иммуноглобулина, а сыворотки анти-Gm(a) — даже 0,000025 мг. При проведении указанных процедур происходит реакция, основанная на следующем принципе. Антитела анти-Gm и анти-InV направлены на определенные специфичные аллотипические детерминанты С-частей Н- и L-цепей молекулы иммуноглобулина. Эти антитела осаждают в сыворотке те Ig-молекулы, которые содержат эти детерминанты. Однако обычными способами (реакция преципитации в агаре по Оухтерлони, иммуноэлектрофорез) эту преципитацию нельзя или только в крайне редких случаях можно наблюдать. Поэтому в реакции используют неполные антитела анти-Rh_0, относящиеся к классу IgG и имеющие в области С-частей Н- и L-цепей определенные Gm и InV-детерминанты. Поскольку иммунные антитела, к которым относятся неполные антитела анти-Rh_0, чаще всего (как и миеломопротеины) имеют моноклональную природу, т. е. развиваются из одного определенного клеточного клона и очень редко вырабатываются несколькими клеточными клонами, то эти антитела также несут на себе только те факторы или детерминанты, которые соответствуют их классовой или подклассовой специфичности.

Другими словами, существует большое число неполных антител анти-Rh_0, имеющих различную Gm- и InV-специфичность. Так, для получения сывороток анти-Rh_0 со специфичностью Gm(a), т. е. годных для сенсибилизации эритроцитов $0Rh_0$, являющихся индикаторами реакции выявления фактора Gm(a), требуются следующие условия: иммунизация против Rh_0; образование неполных антител со специфичностью IgG; образование антител из тех кле-

точных клонов, которые синтезируют IgG_1; генетическая выраженность γ_1-цепей этой молекулы, обусловленная действием аллеля Gm^a. Нахождение неполного антитела анти-Rh_0 с необходимой Gm-специфичностью зависит, во-первых, от того, какую часть (в процентах) изотипического Ig-класса составляет Ig-подкласс, в молекулах которого находятся те или иные факторы Gm, и, во-вторых, от частоты встречаемости соответствующего фактора Gm в молекулах этого подкласса.

Если нагрузить (сенсибилизировать) эритроциты группы $0Rh_0$ неполными антителами анти-Rh_0 со специфичностью Gm(a), то V-часть IgG-молекулы этого неполного антирезусного антитела соединится с антигенным рецептором Rh_0 на поверхности $0Rh_0$ эритроцита, а Gm(a) специфичная детерминанта этого неполного антитела останется свободной. Если теперь добавить к сенсибилизированным эритроцитам сыворотку анти-Gm, антитела которой относятся к изотипическому классу макроиммуноглобулинов (IgM) и представляют собой пентамер (эти антитела содержат V-частей, способных связывать антигены со специфичностью Gm(a), в 5 раз больше, чем молекула IgG неполного резусного антитела), то, естественно, произойдет агглютинация эритроцитов.

Прежде всего, как было показано выше, приводятся во взаимодействие антитела анти-Gm и испытуемая нормальная сыворотка (те 5 мин соединения сыворотки анти-Gm и тест-сыворотки на пластинке до момента добавления сенсибилизированных эритроцитов). Если в испытуемой сыворотке отсутствуют IgG-молекулы со специфичностью Gm(a), то наступает упомянутая агглютинация сенсибилизированных эритроцитов. Если же испытуемая сыворотка содержит IgG-молекулы со специфичностью Gm(a), то они свяжутся с антителами анти-Gm(a), которые уже не смогут реагировать с сенсибилизированными эритроцитами и агглютинация не произойдет (задержка или торможение агглютинации).

Таким образом, в противоположность обнаружению других агглютинабельных факторов крови, когда агглютинация испытуемых эритроцитов соответствующим антителом означает присутствие в них соответствующего антигена, при реакции торможения агглютинации наблюдается иная картина: агглютинация означает отсутствие, а ее отсутствие — наличие того или иного фактора иммуноглобулиновых систем (Gm, InV, Am, ISf).

Значительной проблемой при выявлении иммуноглобулиновых групп является получение специфичных сывороток анти-Gm. В настоящее время Gm-антитела можно получить следующими путями.

1. Из сыворотки крови здоровых людей. Такие антитела анти-Gm чаще всего моноспецифичны, но обычно обладают низким титром и весьма непостоянны, т. е. могут исчезать на время и снова появляться в крови человека. Эти сыворотки анти-Gm обозначают сыворотками «SNagg» (сыворотки нормальные агглютинирующие).
2. Из сывороток крови больных первичным хроническим полиартритом. Антитела анти-Gm, получаемые из этих сывороток, нередко бывают полиспецифичными (поливалентными) против нескольких факторов системы Gm. Их титр чаще всего относительно высокий, но непостоянен. Иногда такие сыворотки анти-Gm могут давать неспецифическую реакцию (особенно при применении недостаточно разведенных нормальных, испытуемых сывороток). Эти сыворотки обозначают сыворотками «Ragg» (ревматоидные агглютинаторы).
3. Гетероиммунные антитела можно получить: а) путем иммунизации кроликов человеческой сывороткой крови группы Gm (a+) с последующей абсорбцией эритроцитами группы Gm(a—) [Luczkiewicz-Mulczykowa A., 1964]; б) путем иммунизации обезьян очищенным человеческим гаммаглобулином; в) путем иммунизации кроликов очищенным миеломопротеином; г) путем иммунизации коз очищенным миеломопротеином.

Система Gm

Система Gm была открыта R. Grubb (1956), а также R. Grubb и A. Laurell (1956). Эта система является одной из наиболее сложных генетических систем крови человека, включающей в себя большое число различных факторов, связанных друг с другом сложными генетическими отношениями.

Первая единая номенклатура факторов, фенотипов и аллелей Gm была принята в 1960 г. и в 1961 г. опубликована R. Grubb. Аллели обозначались Gm^a, Gm^b и т. д., факторы — Gm(a), Gm(b) и т. д., фенотипы — Gm(a+b+),

Gm(a—b+) и т. д. В 1965 г. ВОЗ приняла новую номенклатуру системы Gm. Согласно этой номенклатуре, аллели обозначаются Gm^1, Gm^2 и т. д., факторы — Gm (1), Gm (2) и т. д., фенотипы — Gm(1, —2,5) и т. д. по числу исследованных факторов, наличие которых обозначается цифрой без минуса, а отсутствие — минусом перед соответствующим цифровым обозначением фактора. Факторы друг от друга отделяются в фенотипе запятой.

Старая номенклатура		*Новая номенклатура*	
a	1	b^4	14
x	2	s	15
b^w, b^2	3*	t	16
f	4*	z	17
b, b^1	5*	IgR0(2)	18
like, c, c^3	6	IgR0(3)	19
r	7	g	20
e	8		21
P	9	y	22
b^a, b^5	10	n	23
b^b, b^0	11	c^5	24
b	12*	Bet	25*
b^3	13*	m	26

* По-видимому, факторы Gm(3) и Gm(4), Gm(5) и Gm(12), Gm(13) и Gm(25) идентичны.

Необходимо отметить, что все факторы Gm являются подклассоспецифичными и каждый подкласс отличается специфичным полиморфизмом.

Для лучшего понимания генетики системы Gm попытаемся разобрать все ее подклассовые маркеры.

Все факторы системы Gm являются генетическими маркерами четырех подклассов IgG человека: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4.

Генетическими маркерами Fc-частей γ_1-иммуноглобулиновой цепи являются факторы Gm(1), Gm(2), а также тесно сцепленные с Gm(1) факторы Gm(7), Gm(18), Gm(20) и Gm(22). Генетическими маркерами Fd-частей γ_1-иммуноглобулиновой цепи являются факторы Gm(3), Gm(4), Gm(17), а маркерами γ_2-цепи — факторы Gm(8) и Gm(23). Маркерами γ_3-цепи служат 12 факторов системы Gm : Gm(5), Gm(6), Gm(10) — Gm(16), Gm(21), Gm(24), Gm(25). Факторы Gm(12) и Gm(15), а также Gm(13) и Gm(25), по-видимому, идентичны.

Генные комплексы системы Gm. Генетическое управление отдельными подклассоспецифичными факторами си-

стемы Gm происходит гаплотипично, т. е. все подклассоспецифичные аллели системы Gm, контролирующие появление всех ее аллотипических маркеров, или факторов, наследуются не по отдельности, а целыми генными комплексами. В этом плане сывороточная система Gm очень близка к эритроцитарной системе Ph и системе тканевых антигенов HLA. При этом следует также помнить, что все наиболее распространенные генные комплексы системы Gm четко разграничиваются по трем основным человеческим расам (европеоидной, монголоидной и негроидной). В табл. 13 приведены важнейшие генные комплексы системы Gm для подклассов IgG_1 и IgG_3 с учетом их встречаемости в трех различных расовых группах.

Таблица 13

Наиболее распространенные генные комплексы системы Gm для γ_1- и γ_3-иммуноглобулиновых подклассов

Популяция	IgG_1				IgG_3												Генные комплексы IgG_1	Генные комплексы IgG_3
	z	a	x	f	g	b^0	b^1	b^3	b^4	b^5	Pa	Ray	s	t	c^3	c^5		
Европеоидная	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	*za*	g Pa
	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	*zax*	g Pa
	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	*f*	$b^0b^1b^3b^4b^5$ PaRay
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Монголоидная	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	*af*	$b^0b^1b^3b^4b^5$ PaRay
	+	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	*za*	$b^0b^3b^5$ Ray st
	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	*za*	g Pa
	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	*zax*	g Pa
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Негроидная	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	*za*	$b^0b^1b^3b^4b^5$ PaRay
	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	—	+	+	*za*	b^0b^1Pac^3c^5
	+	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	+	—	—	—	*za*	$b^0b^3b^5$ Ray s
	+	+	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	*za*	$b^0b^1b^4b^5$ PaRayc^3

Детальное ознакомление с данными табл. 13 дает судебно-медицинскому эксперту значительную информацию о возможности использования генных комплексов и генотипов системы Gm (а не отдельных факторов этой системы, как, к сожалению, до сих пор и исследовали) в экспертизах спорного происхождения детей.

Действительно, если ограничиться, например, исследованием только трех хорошо выявляемых факторов системы

Gm: Gm(a), Gm(x) и Gm(f), то и тогда можно почти точно (если речь идет об европеоидных популяциях) устанавливать один из шести возможных генотипов Gm γ_1-иммуноглобулинов. На основании этого и будет решаться вопрос о возможности или невозможности рождения ребенка от определенной родительской пары. Отсутствие довольно редкой сыворотки анти-Gm(z) или анти-Gm(17), открывающей фактор Gm(z) или Gm(17), не будет при этом иметь никакого значения, поскольку в европеоидных популяциях наблюдается полная корреляция факторов Gm(a) и Gm(z), проявляющаяся их одновременным нахождением или отсутствием у того или иного лица.

Из табл. 13 видно, что в европеоидных популяциях для IgG_1 имеются только три аллельных сочетания, или генных комплекса, системы Gm: *za, zax* и *f*. Из этого следует, что все люди белой расы по системе Gm γ_1-иммуноглобулинов генотипически могут быть подразделены на шесть групп (табл. 14).

Таблица 14

Генотипы системы Gm

Генотип	Реакция с сыворотками		
	анти-Gm (a)	анти-Gm (x)	анти-Gm (f)
za/za	+	—	—
za/zax	+	+	—
za/f	+	—	+
zax/xax	+	+	—
zax/f	+	+	+
f/f	—	—	+

Одновременное исследование антисыворотками анти-Gm(a), анти-Gm(x) и анти-Gm(f) позволяет эксперту в 4 из 6 случаев точно устанавливать генотип Gm γ_1-иммуноглобулинов у конкретного лица европеоидной расы: *za/za* при фенотипе Gm(a+x—f—), *za/f* при фенотипе Gm(a+x—f+), *zax/f* при фенотипе Gm(a+x+f+) и *f/f* при фенотипе Gm(a—x—f+). Фенотип же Gm(a+x+f—) может соответствовать двум генотипическим комбинациям *za/zax* и *zax/zax*. Для установления истинного генотипа Gm в данном случае могут быть использованы сыворотки анти-Gm(x), улавливающие «эффект дозы», т. е. значительно сильнее серологически взаимодействующие с факторами, антигенная реализация которых обусловлена соответствующими аллелями или аллельными сочетаниями

в генных локусах двух гомологичных хромосом по сравнению с факторами, появление которых обусловлено действием соответствующего аллеля или аллельного сочетания в генном локусе только одной из двух гомологичных хромосом.

Каким же путем следует идти судебно-медицинскому эксперту при подборе сывороток анти-Gm(x), улавливающих «эффект дозы»? Во-первых, ему прежде всего необходимо иметь в качестве образца сыворотку крови европеоида с фенотипом Gm(a+x+f+), который отражает его единственно возможную генотипическую характеристику *zax/f*. Этот генотип гетерозиготный, поскольку аллельный комплекс *zax*, антигенно реализующий появление фактора Gm(x) [наряду с факторами Gm(a) и Gm(z)], располагается в соответствующем генном локусе системы *Gm* лишь на одной гомологичной хромосоме, на другой же хромосоме в генном локусе *Gm* соответствующего аллельного комплекса, ответственного за реализацию фактора Gm(x), не имеется. Имея в распоряжении такую сыворотку, эксперт предельно разводит ее изотоническим раствором NaCl (приблизительно 1 : 30—1 : 40) и испытывает ее с имеющейся сывороткой (или сыворотками) анти-Gm(x) желательно низкого титра (1 : 4—1 : 8). При предельном разведении испытуемой сыворотки Gm(a+ +x+f+) с генотипом *zax/f*, после ее взаимодействия с сывороткой анти-Gm(x) и последующего добавления $0Rh_0$-эритроцитов, сенсибилизированных неполными антителами анти-Rh_0 со специфичностью Gm(x), не наступает полной задержки агглютинации сенсибилизированных эритроцитов, а отмечается их микроагглютинация («песок»). В аналогичных условиях исследуют серию сывороток с фенотипом Gm(a+x+f—), которые генотипически могут характеризоваться как *za/zax* или же *zax/zax*. Если в некоторых образцах значительно разведенных сывороток Gm(a+x+f—) наступает полная задержка агглютинации, а в других лишь значительное ее ослабление («мелкопесочная» микроагглютинация), то, вероятнее всего, примененная экспертом сыворотка анти-Gm(x) улавливает, по-видимому, «эффект дозы» и неодинаково реагирует с фактором Gm(x) при генотипах *za/zax* и *zax/zax*.

Такой путь подбора улавливающих «эффект дозы» сывороток анти-Gm(x), используемых в дальнейшем для выяснения истинного генотипа у лица с фенотипом Gm(a+x+f—), не единственный. Более сложным, но,

пожалуй, наиболее правильным и гарантирующим верную оценку серологических свойств имеющихся в распоряжении сывороток анти-Gm(x) является несколько иной путь, заключающийся в следующем. Для того чтобы найти сыворотку анти-Gm(x), улавливающую «эффект дозы», в принципе нужно иметь для сравнения всего два образца сывороток Gm(x+): один — генотипически гетерозиготный *zax/f*, другой — генотипически гомозиготный *zax/zax*. Первый образец найти сравнительно просто, поскольку фенотип Gm(a+x+f+) отражает как раз единственно возможную гетерозиготную генотипическую комбинацию *zax/f*, а второй же — значительно труднее. Это объясняется тем, что фенотип Gm(a+x+f—), отражающий гомозиготную генотипическую комбинацию *zax/zax*, может также соответствовать и гетерозиготному генотипу *za/zax*.

Как же в имеющихся образцах сывороток крови Gm(a+x+f—) точно узнать, какому из двух возможных генотипов *za/zax* или *zax/zax* соответствует каждый из них? В этом случае эксперту может помочь только исследование крови родителей или ближайших родственников (братьев, сестер), лица, имеющего фенотип Gm(a+x+f—). Если, например, донор Gm(a+x+f—) имеет отца и мать с фенотипом Gm(a+x+f+), отражающим генотипическую комбинацию *zax/f*, то этим самым доказывается, что их ребенок, имеющий фенотип Gm(a+x+f—), является генотипически гомозиготным *zax/zax*. Конечно же, такой поиск не прост, однако крупные судебно-медицинские учреждения совместно с учреждениями служб крови должны находить соответствующие образцы сывороток, необходимые для проведения контрольных исследований. Судебно-медицинский эксперт, имеющий в распоряжении генотипически гомо- и гетерозиготные образцы Gm(x+), сможет подобрать сыворотку анти-Gm(x), улавливающую «эффект дозы». Таким образом, с помощью трех сывороток анти-Gm(a), анти-Gm(x) и анти-Gm(f) можно четко диагностировать среди европеоидных популяций шесть возможных генотипов, обусловливающих появление аллотипических генетических маркеров, или факторов, Gm на γ_1-иммуноглобулиновых полипептидных цепях: *Gm(a, 1)*, *Gm(x, 2)*, *Gm(f, 4)* и *Gm(z, 17)*.

Обязательное комплексное исследование факторов системы Gm значительно расширит возможности при проведении экспертиз в делах о спорном происхождении детей. Продемонстрируем это следующим примером.

В настоящее время даже в крупных судебно-медицинских лабораториях нашей страны при использовании в экспертизах спорного отцовства системы Gm [главным образом фактора Gm(a)] и в лучшем случае совместно факторов Gm(a) и Gm(x) результаты исследования крови ребенка, его матери и предполагаемого отца оценивают изолированно, по отдельным факторам Gm, не принимая во внимание гаплотипичный порядок наследования аллотипических маркеров этой системы. При этом исходят из того, что в браках Gm(a—)×Gm(a—) и соответственно Gm(x—)×Gm(x—) не могут родиться дети Gm(a+) и Gm(x+), а в браках Gm(a+)×Gm(a+) или Gm(x+)× ×Gm(x+) рождение детей Gm(a—) и Gm(x—) возможно.

Действительно, это так. Но это слишком упрощенный подход к законам наследования генетически обусловленных маркеров крови человека, основанный на недостаточно глубоком знании всех генетических особенностей системы Gm. Как, например, рассуждает неквалифицированный эксперт, обнаружив у матери ребенка и у предполагаемого отца фактор Gm(a), а у ребенка отсутствие этого фактора? Он делает вывод о том, что отцовство ответчика в отношении данного ребенка по фактору Gm(a) системы Gm не исключается. Обосновывает эксперт это тем, что, согласно законам наследования, у ребенка не может быть генетического признака, отсутствующего у его родителей, и, наоборот, может отсутствовать признак, имеющийся у обоих родителей. Знающий эксперт объяснит это более грамотно, поскольку он понимает, что любой фенотипически проявившийся генетический признак генотипически мог быть как гомозиготным, так и гетерозиготным по соответствующим аллелям. Если у обоих родителей ребенка имелся гетерозиготный генотип какого-то реализованного признака и если у обоих на гомологичной хромосоме в соответствующем генном локусе имелся аллельный ген, не обусловливающий реализацию этого признака, то каждый из родителей мог передать его по наследству своему ребенку, в связи с чем у него будет отсутствовать признак, имеющийся у родителей. Однако применительно к данному случаю квалифицированный эксперт отметит следующее. У ребенка с фенотипом Gm(a—) может быть единственно возможный гомозиготный генотип *f/f*, причем один аллель *f* он унаследовал от матери, другой — от отца. Далее опытный эксперт будет рассуждать приблизитель-

но так. Фенотип Gm(a+), выявленный им у матери ребенка и его предполагаемого отца, в принципе означает лишь то, что оба они генотипически могут характеризоваться следующими пятью возможными комбинациями: *za/za*, *za/zax*, *za/f*, *zax/zax* и *zax/f*. У матери ребенка может быть, естественно, только один из двух возможных генотипов *za/f* или *zax/f*, иначе это не ее ребенок. Истинный отец ребенка, или, как сейчас говорят, «биологический» отец, также должен иметь один из этих двух генотипов, в противном случае он не может быть отцом ребенка с фенотипом Gm(a—).

Таким образом, учитывая гаплотипичный порядок наследования факторов системы Gm, судебно-медицинский эксперт обязательно должен провести исследование крови ответчика на наличие фактора Gm(f,4), которое в данном случае может быть решающим, поскольку отсутствие фактора Gm(f,4) у ответчика исключает его в качестве отца этого ребенка. Это же сочетание — мать Gm(a+), ребенок Gm(a—) — можно использовать (естественно, наряду с другими генетически детерминированными системами крови) для выяснения вопроса о возможном перепутывании или замене детей в родильных домах. Отсутствие в крови матери γ-иммуноглобулинового фактора Gm(f,4) при наличии фактора Gm(a,1) фенотип Gm(1,—4) исключает ее материнство по отношению к ребенку, имеющему фенотип Gm(—1,4).

Приведем еще один пример, демонстрирующий важность знаний гаплотипичного характера наследования факторов системы Gm для решения судебно-медицинских вопросов о спорном происхождении ребенка.

Ребенок имеет фенотип Gm(a+x+f—), мать ребенка — фенотип Gm(a+x+f+), ответчик — фенотип Gm(a+x+f—). Если же оценивать эти данные изолированно по отдельным факторам системы Gm, то эксперт сделает вроде бы безошибочный вывод о том, что отцовство ответчика в отношении данного ребенка с учетом исследования трех факторов системы Gm [Gm(a), Gm(x) и Gm(f)] не исключается. Однако этот вывод вытекает из устаревших воззрений на генетическую природу наследования факторов системы Gm и в настоящее время не может быть признан правильным. Сейчас, когда в результате многочисленных популяционно-генетических исследований расширились и углубились знания о наследственной передаче генетических маркеров системы Gm, вправе

требовать от судебно-медицинских экспертов более конкретных выводов в отношении возможности или невозможности рождения ребенка от упомянутой выше родительской пары.

Эксперт должен понимать, что ребенок и предполагаемый отец этого ребенка с фенотипом Gm(a+x+f−) могут иметь два возможных генотипа *zax/zax* или *za/zax*, а мать ребенка, имеющая фенотип Gm(a+x+f+), обладает единственно возможной для нее генотипической комбинацией *zax/f*. При этом ребенок, не имеющий в γ-иммуноглобулиновом наборе фактора Gm(f), мог получить от матери только ту хромосому, в соответствующем генном локусе которой содержится аллельное сочетание, или генный комплекс, ответственный за появление факторов Gm(a) и Gm(x), т. е. *zax*. Другую же хромосому, несущую генную информацию для обоих факторов Gm(a) и Gm(x) [или же только для одного фактора Gm(a)!], он получил от отца. Итак, мать передала ребенку генный комплекс *zax*, его отец — либо *zax*, либо *za*. Сложилась весьма любопытная ситуация, при которой чрезвычайно важно знать истинные генотипы ребенка и его предполагаемого отца. Действительно, если эксперт сумеет доказать, например, тождественность генотипических комбинаций ребенка и его предполагаемого отца (*za/zax* или *zax/zax*), то ответчик не может быть исключен в качестве отца ребенка. В противном случае при несовпадении генотипических комбинаций ребенка и его предполагаемого отца (*zax/zax* у ребенка и *za/zax* у предполагаемого отца и наоборот) отцовство ответчика в отношении данного ребенка исключается. На что в этом случае должен обращать внимание судебно-медицинский эксперт? Естественно, на характер реакции сыворотки анти-Gm(x), улавливающей «эффект дозы», с образцами сывороток крови всех проходящих по делу лиц.

В данном случае большое значение имеет выраженность торможения агглютинации сенсибилизированных эритроцитов со специфичностью Gm(x) сывороткой крови матери ребенка, поскольку только на одной ее хромосоме имеется аллельный комплекс, ответственный за появление фактора Gm(x). Сравнивая выраженность фактора Gm(x) в крови ребенка, его матери и предполагаемого отца (по выраженности задержки агглютинации), эксперт может получить весьма ценные данные о генотипах системы Gm ребенка и ответчика и в зависимости от этого решить во-

прос, может ли ответчик быть отцом ребенка или же его отцовство исключается. Например, если выраженность фактора Gm(x) у ребенка и его матери будет приблизительно одинаковой, а у предполагаемого отца значительно выше [о чем можно будет судить по реакции с сывороткой анти-Gm(x)], то это свидетельствует о том, что ребенок и ответчик хотя и имеют одинаковый фенотип Gm(a+x+f−), однако обладают различными генотипическими комбинациями, причем если у ответчика имеется гомозиготный генотип *zax/zax*, то у ребенка он гетерозиготный *za/zax*.

На основании логических размышлений и учитывая характер серологических реакций, в данном случае эксперт должен исключить ответчика в качестве отца ребенка. Мы уже знаем, что мать ребенка с генотипом *zax/f* передала ему генный комплекс *zax*. Ее ребенок, имеющий гетерозиготный генотип *za/zax*, генный комплекс *zax* получил от матери, а генный комплекс *za* мог получить только от отца. Ответчик же, генотипически гомозиготный *zax/zax*, не мог передать ребенку генный комплекс *za*, поскольку он отсутствует в его генотипическом наборе. Следовательно, ответчик исключается в качестве отца ребенка.

Поскольку такой вывод является чрезвычайно ответственным, эксперт должен точно установить генотипическую гомозиготность ответчика (*zax/zax*), исключающую его отцовство. При этом иногда эксперту может помочь исследование крови родителей ответчика. Действительно, если ответчик с фенотипом Gm(a+x+f−) (возможные генотипы *zax/zax* или *za/zax*) имеет отца и мать с фенотипом Gm(a+x+f+) (единственный возможный генотип *zax/f*), то этим самым доказывается генотипическая комбинация *zax/zax* и исключается возможность генотипической комбинации *za/zax*.

Приведенные примеры убедительно свидетельствуют о перспективности использования генетически обусловленного полиморфизма системы Gm (даже одного γ_1-иммуноглобулинового подкласса!) для судебно-медицинской экспертизы спорного происхождения детей. Однако, помимо четких и глубоких знаний генетических особенностей системы Gm, оно требует от эксперта и высокой квалификации, позволяющей избежать возможности ошибочно интерпретировать результаты реакции задержки агглютинации. Приведенные примеры демонстрируют также исключительную ценность расширенного исследования

гаплотипичного набора генетических маркеров системы Gm у родителей и ближайших родственников лиц, проходящих по делу в связи со спорным происхождением ребенка. Такое исследование очень часто (по мнению O. Prokop, приблизительно в 50% случаев) дает информацию о генотипическом наборе ребенка, его матери и предполагаемого отца, без знания которого решение вопроса о возможности рождения ребенка от конкретной родительской пары не представляется возможным.

Использование исключительно широкого Gm-полиморфизма γ_3-иммуноглобулинового подкласса [факторы Gm(g,21), (b^0,11), (b^1,5), (b^3,13), (b^4,14), (Pa «не-маркер»), (Ray «не-маркер»), (s,15), (t,16), (c^3,6), (c^5,24)] из-за трудности получения и крайней редкости большинства антисывороток, выявляющих эти факторы, не нашло пока широкого применения в судебно-медицинских экспертизах в делах о спорном происхождении ребенка. Это, правда, не относится к антисыворотке анти-Gm(10), выявляющей в сыворотке крови людей фактор Gm(b^5,10). Достаточно отметить, что многие зарубежные фирмы, институты и лаборатории, изготавливающие для диагностических целей иммунные серологические препараты и реагенты, выпускают даже так называемую «сцепленную» антисыворотку анти-Gm (f, b^5,4,10), выявляющую оба фактора Gm(4) и Gm(10), несмотря на то что последние располагаются на разных (γ_1 и γ_3) полипептидных цепях γ-иммуноглобулинов.

Результаты многочисленных популяционно-генетических обследований, проведенных в различных расовых популяциях, свидетельствуют о том, что фактор Gm(10) наряду с факторами Gm(1), Gm(2) и Gm(4) должен найти широкое применение в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей. Учитывая эти генетически обусловленные маркеры системы Gm у представителей трех рас, можно выявить основные аллельные сочетания, генные комплексы или гаплотипы, которые передаются ребенку от его родителей. По этим основным гаплотипам системы Gm можно определить число основных генотипических комбинаций, на основании которых и решается вопрос о возможности или невозможности рождения ребенка от определенной родительской пары.

Например, европеоиды характеризуются тремя основными гаплотипами системы Gm 1, 1,2 и 4,10 с частотой встречаемости соответственно 18—20, 2—10 и 65—70%.

У монголоидов возможны четыре гаплотипа, два из которых (1 и 1,2) свойственны также и европеоидам, а два других (1,4,10 и 1,10) у европеоидов не встречаются. Данные антропологической популяционной генетики свидетельствуют о том, что частота встречаемости этих четырех гаплотипов среди различных монголоидных популяций значительно варьирует и составляет для гаплотипов 1; 1,2; 1,4,10 и 1,10 соответственно 20—70, 2—10, 10—100 и 10—25%. В негроидных популяциях, как отмечалось выше, отсутствуют факторы Gm(x,2) и Gm(f,4), поэтому гаплотипичный набор генных комплексов с учетом всех перечисленных факторов системы Gm будет несколько скуднее. Он включает три основных гаплотипа 1,5,10, 1 и 1,10, причем гаплотип 1,5,10 преобладает, а гаплотип 1,10 крайне редок и наблюдается лишь у бушменов.

Для нашей многонациональной страны, в которой проживают не только многочисленные народы и нации, но и огромное число людей, родившихся от «смешанных» браков, знание экспертами основных гаплотипов системы Gm, особенно характерных для европеоидных и монголоидных популяций, является обязательным. Без этого в настоящее время нельзя уловить генотипические комбинации системы Gm у проходящих по делу лиц, а следовательно, нельзя в полной мере использовать генетическое многообразие этой системы для судебно-медицинского решения вопроса о спорном происхождении ребенка.

При использовании системы Gm [четырех ее факторов Gm (1), (2), (4) и (10)] в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей можно, по-видимому, встретиться не с тремя гаплотипами, характерными для европеоидных, а с пятью, характерными как для европеоидных, так и монголоидных популяций. Гаплотипы 1; 1,2; 4,10; 1,4,10 и 1,10 могут образовать 15 генотипических комбинаций системы Gm (табл. 15).

По реакции с четырьмя сыворотками (см. табл. 15) судебно-медицинский эксперт непосредственно может установить лишь три генотипа системы Gm, поскольку фенотипы Gm(1,—2,—4,—10), Gm(1,2,—4,10) и Gm(—1,—2,4,10) характеризуют единственно возможные генотипические комбинации для данных фенотипов: *1/1, 1,2/1,10* и *4,10/4,10* соответственно. Каждому из трех других фенотипов системы Gm — Gm(1,2,—4,—10), Gm(1,—2,—4,10) и Gm(1,2,4,10) могут соответствовать две возможные генотипические комбинации: для фенотипа Gm(1,2,

Таблица 15

Возможные генотипы системы Gm в европеоидных и монголоидных популяциях с учетом факторов Gm(1), Gm(2), Gm(4), Gm(10)

Генотип	Реакция с антисыворотками			
	анти-Gm (1)	анти-Gm (2)	анти-Gm (4)	анти-Gm (10)
1/1	+	—	—	—
1/1, 2	+	+	—	—
1/4, 10	+	—	+	+
1/1, 4, 10	+	—	+	+
1/1, 10	+	—	—	+
1, 2/1, 2	+	+	—	—
1, 2/4, 10	+	+	+	+
1, 2/1, 4, 10	+	+	+	+
1, 2/1, 10	+	+	—	+
4, 10/4, 10	—	—	+	+
4, 10/1, 4, 10	+	—	+	+
4, 10/1, 10	+	—	+	+
1, 4, 10/1, 4, 10	+	—	+	+
1, 4, 10/1, 10	+	—	+	+
1, 10/1, 10	+	—	—	+

—4,—10) генотипы *1/1,2* и *1,2/1,2*, для фенотипа Gm(1, —2,—4,10) генотипы *1/1,10* и *1,10/1,10*, для фенотипа Gm(1,2,4,10) генотипы *1,2/4,10* и *1,2/1,4,10*. Установить истинный генотип у лиц, имеющих один из трех названных фенотипов, эксперту помогут исследования крови ближайших родственников этого человека.

Например, мать ребенка имеет фенотип Gm(1,2,—4, —10), т. е. генотипически может быть как *1/1,2*, так и 1,2/1,2. Для выяснения вопроса о возможности рождения ребенка от конкретной родительской пары эксперту чрезвычайно важно знать истинный генотип матери ребенка, по которому он сможет определить, какой генный комплекс — *1* или *1,2* (или только *1,2*!) — она передала своему ребенку. Исследование крови бабушки и дедушки ребенка по матери показало, что они имеют фенотип Gm(1,2—4,10), который соответствует единственно возможной генотипической комбинации *1,2/1,10*. С учетом фенотипа матери ребенка судебно-медицинский эксперт, логически размышляя, может легко установить ее истинный генотип *1,2/1,2* и тем самым доказать возможность передачи по наследству своему ребенку только генного комплекса *1,2*, исключить возможность передачи генного комплекса, отсутствующего в генотипическом наборе матери.

Установить истинный генотип системы Gm у лица с фенотипом (1,—2,—4,10) (возможные генотипы *1/1,10*, или *1,10/1,10*) также довольно просто. Если, например, один из родителей этого человека или же его братья и сестры имеют фенотип Gm(1,—2,—4,—10), отражающий единственно возможный генотип *1/1*, то этим самым доказывается, что у этого лица возможен только генотип *1/1,10* и исключается возможность генотипической комбинации *1,10/1,10*. Тот же подход позволит эксперту установить истинный генотип системы Gm у лица с фенотипом Gm(1,2,4,10), отражающим две возможные генотипические комбинации *1,2/4,10* или *1,2/1,4,10*. Если у кого-нибудь из ближайших родственников этого человека (матери, отца, братьев, сестер) имеется фенотип Gm(a—), отражающий единственно возможный генотип *4,10/4,10*, то этим доказывается его генотипическая комбинация *1,2/4,10* и исключается генотипическая комбинация *1,2/1,4,10*.

Таким образом, комплексное исследование четырех генетически сцепленных факторов системы Gm [Gm(1), (2), (4) и (10)] наряду с расширенным исследованием крови ближайших родственников лиц, проходящих по делам о спорном происхождении ребенка, дадут возможность точно установить 9 из 15 возможных генотипических комбинаций системы Gm, по которым эксперт и будет судить о возможности или невозможности рождения ребенка от конкретной родительской пары.

Дифференцировать шесть других генотипических комбинаций (*1/4,10*, *1/1,4,10*, *4,10/1,4,10*, *4,10/1,10*, *1,4,10/1,4,10*, *1,4,10/1,10*) несколько труднее, но все же возможно. И в этом эксперту опять же придет на помощь исследование крови ближайших родственников лица с фенотипом Gm(1,—2,4,10), отражающим шесть возможных перечисленных выше генотипических комбинаций. Если, например, кто-либо из ближайших родственников лица с фенотипом Gm(1,—2,4,10) имеет фенотип Gm(1,—2,—4,—10) (единственно возможная генотипическая комбинация *1/1*!), то сразу же исключается возможность наличия у этого человека четырех генотипических комбинаций (*4,10/1,4,10*, *4,10/1,10*, *1,4,10/1,4,10*, *1,4,10/1,10*) и эксперту остается дифференцировать у него лишь два оставшихся возможных генотипа (*1/4,10* или же *1/1,4,10*). При наличии ближайшего родственника с фенотипом Gm(a—), отражающим единственно возможный генотип *4,10/4,10*, у этого лица совершенно четко определяется его

истинный генотип *1/4,10* и исключается последний из «возможных» генотипов *1/1,4,10*.

Приблизительно так же эксперт должен рассуждать, если он у лица с фенотипом Gm(1,—2,—10) обнаружил близкого родственника с фенотипом Gm(a—). Этим сразу же сужается круг возможных генотипических комбинаций с шести до трех (исключаются генотипы *1/1,4,10*, *1,4,10/1,4,10* и *1,4,10/1,10*). Дальнейшая дифференцировка трех оставшихся возможных генотипических комбинаций (*1/4,10*, *4,10/1,4,10* и *4,10/1,10*) для установления истинного генотипа системы Gm должна проводиться по тому же принципу с исследованием крови ближайших родственников этого человека, а также с использованием антисывороток анти-Gm(4) и анти-Gm(10), улавливающих так называемый «эффект дозы».

Заканчивая главу, посвященную использованию генетически обусловленных маркеров систем Gm в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей, упомянем о сроках онтогенетического формирования факторов Gm в сыворотке крови человека.

Показано, что в начале внутриутробной жизни в организме плода синтез γ-иммуноглобулинов не происходит и в этот момент у плода имеются только материнские γ-иммуноглобулины. Самостоятельный синтез IgG начинается у ребенка только в первые месяцы со дня его рождения, поэтому этот факт должен обязательно приниматься во внимание экспертами при использовании полиморфизма системы Gm в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей, особенно при проведении их в ранние сроки жизни ребенка.

В крови новорожденных уровень IgG достаточно высок, что позволяет, например, беспрепятственно выявлять в крови фактор Gm(a). Однако показано, что этот γ-иммуноглобулиновый маркер не ребенка, а матери. Материнский γ-иммуноглобулин постепенно исчезает из крови ребенка и примерно через 3 мес после рождения уже не обнаруживается. Некоторые исследователи указывают на более ранние сроки исчезновения материнского IgG из крови ребенка. В возрасте 3—4 мес собственного IgG у ребенка вырабатывается очень мало, поэтому в этот срок генетические факторы Gm у ребенка можно и не обнаружить со всеми вытекающими из этого последствиями. Уровень γ-иммуноглобулина в сыворотке крови ребенка с возрастом постепенно повышается и в конце первого года жизни до-

стигает нижней границы содержания γ-иммуноглобулина взрослого человека.

Большинство исследователей отмечают, что уже в возрасте 7—10 мес у детей можно выявлять почти все генетические маркеры системы Gm. Другие авторы приводят и более ранний возраст. Так, J. Herbich (1962), исследовав большую группу детей, пришел к выводу, что уже в возрасте 4—6 мес у ребенка можно выявлять «собственный» фактор Gm(a). Некоторым исследователям удавалось обнаружить фактор Gm(a) у детей и в более раннем возрасте, причем о его «детской», а не материнской природе свидетельствовал материнский фенотип Gm(a—). Однако некоторые исследователи указывают, что для судебно-медицинских целей можно принимать во внимание исследование детей только в возрасте старше 8 мес. С этим мнением нельзя не согласиться, добавив, что в случаях исключения отцовства по генотипам системы Gm при ранних сроках жизни ребенка, по-видимому, необходимо повторное контрольное исследование факторов Gm у ребенка в возрасте 8 мес и более.

Приведенные сведения об онтогенетическом формировании маркеров Gm касаются в основном фактора Gm(a). Относительно сроков онтогенетического формирования других факторов системы Gm у человека сведений гораздо меньше. По данным J. Lundevall (1965), полная выраженность фактора Gm(x) в сыворотке крови ребенка достигается только к 10-му месяцу его жизни.

Учитывая, что все «тормозные» факторы системы Gm, являющиеся аллотипическими генетически обусловленными маркерами, по своей природе относятся к IgG, можно было бы предполагать, что физиологическая агаммаиммуноглобулинемия новорожденных также будет влиять и на содержание и определение этих факторов в крови детей в первые месяцы их жизни. Однако данные C. Ropartz и соавт. (1965) опровергают это предположение и в определенной степени не согласуются с приведенными выше сведениями. При исследовании 81 пары мать — новорожденный авторы отметили только два случая, когда у матери не было факторов Gm(a) и Gm(e), но они присутствовали у детей. Наоборот, отсутствие у ребенка того или иного фактора Gm, имеющегося у матери, наблюдалось довольно часто. Так, фактор Gm(e), имеющийся у матери, отсутствовал у ребенка в 24%, фактор Gm(в) — в 9% и фактор Gm(a) — в 3% случаев. Эти данные представля-

ют большой интерес, поскольку свидетельствуют о способности не всех молекул γ-иммуноглобулина матери в одинаковой степени проникать в кровяное русло ребенка. По всей видимости, одни IgG, имеющие определенную Gm-специфичность, проникают через плаценту в кровь ребенка легче, а другие задерживаются плацентой.

Определенный интерес представляют исследования генетических маркеров системы Gm при агаммаиммуноглобулинемии и гипергаммаиммуноглобулинемии. R. Grubb и A. B. Laurell (1956) впервые отметили, что в случаях физиологической или патологической агаммаиммуноглобулинемии из-за резкого снижения концентрации IgG в сыворотке крови человека генетические маркеры системы Gm могут не выявляться, а это может привести к ошибочной диагностике ее фенотипов. Авторы исследовали 5 случаев агаммаиммуноглобулинемии, которая была подтверждена электрофоретическим анализом, и во всех этих случаях обнаружили фенотип Gm(a—). Впоследствии было исследовано еще 25 случаев агаммаиммуноглобулинемии, при которой также в 100% случаев диагностировалась группа Gm(a—). Некоторые из этих сывороток исследовали на содержание в них такого чрезвычайно распространенного фактора, как Gm(в), причем во всех случаях он не выявлялся и диагностировалась группа Gm(b—). Авторы исследовали одну сыворотку, в которой имелось незначительное количество γ-иммуноглобулина. Эта сыворотка имела совершенно необычную группу Gm(a—x—b—), практически отсутствовавшую у здоровых людей.

Все эти наблюдения, вне всякого сомнения, свидетельствуют о том, что групповые факторы системы Gm могут не выявляться при отсутствии достаточного количества γ-иммуноглобулинов в сыворотке крови человека. Такое состояние может быть как физиологическим (например, у новорожденных), так и при патологических процессах, когда агаммаиммуноглобулинемия или гипогаммаиммуноглобулинемия является врожденной или возникает в процессе жизни.

При использовании полиморфизма системы Gm в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей важно знать результаты исследования ее групповых факторов у лиц не только с агаммаиммуноглобулинемией, но и гипергаммаиммуноглобулинемией.

Необходимо отметить, что некоторые сыворотки анти-Gm(a) типа Ragg могут снижать свою серологическую

активность («тормозиться») под влиянием сывороток Gm(a—) с высокой концентрацией IgG. Это относится также и к другим антисыворотками, например, к сыворотками анти-Gm(x) и анти-Gm(b). В настоящее время считается установленным, что гипергаммаиммуноглобулинемия может повышать также тормозную способность сыворотки группы Gm(a+). Однако следует помнить, что повышенное содержание γ-иммуноглобулина в сыворотке Gm(a—) не может, естественно, привести ее к переходу в группу Gm(a+), а может только лишь завуалировать ее истинный фенотип. Использование же более специфичных сывороток типа SNagg и соответствующее разведение испытуемых сывороток (которое обязательно указывается в аннотации к каждой серии сывороток анти-Gm) гарантируют эксперта от ошибок при исследовании факторов Gm у лиц с гипергаммаиммуноглобулинемией.

Исследования групповых факторов системы Gm у больных с различными патологическими процессами показали, что эти состояния все же не могут вызвать появления специфического или неспецифического γ-иммуноглобулинового тормозного фактора Gm в сыворотке крови больных, не имевших его до заболевания. Патологические изменения белков крови могут, однако, маскировать истинную группу системы Gm. Это обстоятельство нужно непременно учитывать как при генетическом изучении γ-иммуноглобулиновых групп системы Gm, так и при проведении судебно-медицинских экспертиз спорного отцовства, в которых исследуются генетически обусловленные маркеры этой системы.

При проведении судебно-медицинских экспертиз в делах о спорном отцовстве с использованием групп системы Gm эксперт должен помнить, что ввиду физиологической агаммаиммуноглобулинемии у ребенка определение его Gm-факторов может производиться не ранее чем через 6—8 мес после рождения. При исключении ответчика в качестве возможного отца ребенка, который не достиг возраста 6—8 мес (и если такое исключение основывается только на генотипах системы Gm), эксперт обязан провести контрольное исследование сыворотки крови ребенка по достижении последним указанного возраста.

Гипо- или агаммаиммуноглобулинемия может обусловить негативный результат выявления генетических маркеров системы Gm. Поэтому в случаях необнаружения в сыворотке того или иного фактора Gm необходимо выяс-

нить (а еще лучше самому установить, например, с помощью электрофореза или иммуноэлектрофореза), нет ли у данного лица гипо- или агаммаиммуноглобулинемии. Необходимо также помнить, что судебно-медицинское выявление факторов системы Gm надо проводить либо человеческими антисыворотками типа SNagg, либо иммунными сыворотками анти-Gm, значительно более специфичными, чем человеческие сыворотки анти-Gm типа Ragg.

В заключение отметим, что для предотвращения возможных неточностей или ошибок судебно-медицинский эксперт при выявлении того или иного фактора системы Gm обязательно должен использовать в качестве контроля известные ему образцы сывороток крови, в которых присутствует и отсутствует исследуемый γ-иммуноглобулиновый фактор Gm. При этом в первом случае агглютинация сенсибилизированных эритроцитов должна полностью отсутствовать, а во втором должна быть хорошо выраженной. Кроме этих контролей эксперт обязан параллельно проводить еще три контрольных исследования, два из которых относятся к так называемым «отрицательным» контролям и один — к «положительному».

Первый «отрицательный» контроль: сенсибилизированные эритроциты + исследуемая сыворотка (в том же разведении, что и в основном опыте). Агглютинация эритроцитов должна отсутствовать.

Второй «отрицательный» контроль: несенсибилизированные эритроциты + сыворотка анти-Gm. Агглютинация эритроцитов должна отсутствовать.

«Положительный» контроль: сенсибилизированные эритроциты + сыворотка анти-Gm. Должна быть хорошо выраженная агглютинация сенсибилизированных эритроцитов, видимая невооруженным глазом.

Система InV

C. Ropartz, J. Lenoir и L. Rivat (1961) обнаружили и описали одно необычное антитело, найденное ими в сыворотке крови здорового донора. В реакции задержки агглютинации это антитело открывало в сыворотке крови людей неизвестный ранее фактор, причем среди 324 обследованных он был выявлен с частотой встречаемости 18,52%.

Новый сывороточный фактор, выявляемый этим антителом, был назван фактором InV (от Inhibitor V, V — главная буква фамилии донора, у которого впервые было найдено это антитело, названное анти-InV). Результаты семейных обследований свидетельствовали о генетической

природе указанного фактора, причем характер наследования указывал на то, что он является аутосомальным, кодоминантным и независящим от наследования всех в то время известных факторов системы Gm [Gm(a), Gm(x), Gm(like) и Gm(b)]. Популяционные исследования фактора InV в различных расах отчетливо свидетельствовали о явном его преобладании среди негроидной.

A. G. Steinberg и соавт. (1962) обнаружили еще один фактор этой системы, который, по-видимому, являлся генетическим продуктом аллельного по отношению к *InV* гена. Поэтому было предложено обозначить первый открытый фактор этой системы фактором InV(a), а следующий — InV(b). Позднее C. Ropartz, L. Rivat и P. Rousseau (1964) нашли третий фактор этой системы — InV(1). Было доказано тесное сцепление между факторами InV(1) и InV(a), которое проявлялось тем, что InV(a) почти всегда присутствовал совместно с InV(1). Особенно тесная корреляция этих факторов наблюдается среди европеоидов, поскольку частота встречаемости фенотипа InV (1+a—) среди белого населения составляет всего 1%. В дальнейшем для системы InV ВОЗ ввела новую номенклатуру.

Антитела анти-InV по сравнению с антителами анти-Gm встречаются, очевидно, еще реже. Так, H. Ritter и E. Schmidtmann (1964) при исследовании 45277 нормальных сывороток обнаружили только одну (!) антисыворотку анти-InV.

Согласно современным представлениям о генетике сывороточной иммуноглобулиновой системы InV, ее групповой генетически обусловленный полиморфизм контролируется четырьмя аллелями (*InV1*, *InV1,2*, *InV3* и *InV*) в одном аутосомальном кодоминантном генном локусе. При этом три аллеля *InV1*, *InV1,2* и *InV3* ответственны за появление в сыворотке крови соответствующего генетического маркера или фактора, а четвертый аллель *InV* является «супрессорным». Поскольку один из четырех аллелей этой системы антигенно не реализуется, то сывороточная система InV может характеризоваться шестью фенотипами: InV(1,2,3), InV(1,2,—3), InV(1,—2,3), InV(1,—2,—3), InV(—1,—2,3) и InV(—1,—2,—3). В табл. 16 приведены 10 возможных генотипических комбинаций системы InV, образующих шесть ее фенотипов, или групп. Для наглядности в ней представлены реакции с тремя сыворотками анти-InV, соответствующие каждому

генотипу и фенотипу системы, причем знаком «плюс» отмечается выявление того или иного фактора системы, т. е. задержка агглютинации сенсибилизированных эритроцитов.

Таблица 16

Сочетание у человека возможных генотипов и фенотипов системы InV

Генотип	Реакция с сыворотками			Фенотип
	анти-InV (1)	анти-InV (2)	анти-InV (3)	
InV^1/InV^1	+	—	—	InV(1, —2, —3)
$InV^1/InV^{1,2}$	+	+	—	InV(1, 2, —3)
InV^1/InV^3	+	—	+	InV(1, —2, 3)
InV^1/InV	+	—	—	InV(1, —2, —3)
$InV^{1,2}/InV^{1,2}$	+	+	—	InV(1, 2, —3)
$InV^{1,2}/InV^3$	+	+	+	InV(1, 2, 3)
$InV^{1,2}/InV$	+	+	—	InV(1, 2, —3)
InV^3/InV^3	—	—	+	InV(—1, —2, 3)
InV^3/InV	—	—	+	InV(—1, —2, 3)
InV/InV	—	—	—	InV(—1, —2, —3)

При ознакомлении с табл. 16 видна ценность иммуноглобулиновой системы InV для судебно-медицинской экспертизы в делах о спорном происхождении ребенка. Действительно, одновременное использование экспертом трех антисывороток дает возможность непосредственно выявить три генотипа системы InV: InV^1/InV^3, $InV^{1,2}/InV^3$ и InV/InV, реализующих появление трех ее фенотипов — соответственно InV(1,—2,3), InV(1,2,3) и InV(—1,—2,—3). Таким образом, трем из шести возможных фенотипов системы InV соответствует единственно возможная (а следовательно, реально определяемая!) генотипическая комбинация, по совокупности которых у ребенка, его матери и предполагаемого отца и решается в настоящее время вопрос о возможности или невозможности рождения ребенка от конкретной родительской пары.

Двум другим фенотипам InV(1,—2,—3) и InV(—1,—2,3) соответствуют всего лишь две возможные генотипические комбинации соответственно: гомозиготная InV^1/InV^1 или гетерозиготная InV^1/InV для первого и гомозиготная InV^3/InV^3 или гетерозиготная InV^3/InV для

второго. Из этого следует, что у судебно-медицинского эксперта имеется значительный шанс правильно установить истинный генотип у проходящих по делу лиц, имеющих фенотипы InV(1,—2,—3) и InV(—1,—2,3). Для этого опять же необходимо исследовать кровь ближайших родственников этих лиц. Например, если у человека с фенотипом InV(1,—2,—3) имеется мать, либо отец, либо братья и сестры, хотя бы у одного из которых имеется фенотип InV(—1,—2,—3) (единственно возможная генотипическая комбинация InV/InV), то этим самым доказывается, что у этого лица имеется гетерозиготная генотипическая комбинация InV^1/InV и исключается «возможность» гомозиготной генотипической комбинации InV^1/InV^1. Приблизительно так же решается вопрос об истинной генотипической комбинации у лиц, имеющих фенотип InV(1,—2,3). Наличие у этих лиц ближайших родственников (родителей, братьев или сестер), хотя бы у одного из которых имеется фенотип InV(—1,—2,—3), определяет их истинную генотипическую гетерозиготную комбинацию InV^3/InV и исключает «возможность» гомозиготной генотипической комбинации InV^3/InV^3. С другой стороны, если у лица с фенотипом InV(—1,—2,3) имеется мать и отец с фенотипом InV(1,—2,3) (единственно возможная генотипическая комбинация InV^1/InV^3!), то этим устанавливается его истинный гомозиготный генотип InV^3/InV^3 и исключается «возможность» гетерозиготного генотипа InV^3/InV.

Определить истинный генотип системы InV у лиц с группой InV(1,2—3) несколько труднее, но вполне реально. Человек с такой группой в принципе имеет один из трех возможных генотипов: либо гомозиготный $InV^{1,2}/InV^{1,2}$, либо один из двух гетерозиготных $InV^1/InV^{1,2}$ и $InV^{1,2}/InV$. Исследование крови ближайших родственников такого лица иногда позволяет определить его истинный генотип системы InV, т. е. единственный из трех «возможных». Если, например, у человека с фенотипом InV(1,2,—3) кто-то из ближайших родственников имеет группу InV(1,—2,3) (единственно возможная генотипическая комбинация InV^1/InV^3!), то этим самым доказывается его истинный генотип $InV^1/InV^{1,2}$ и исключается возможность других генотипических комбинаций: $InV^{1,2}/InV^{1,2}$ и $InV^{1,2}/InV$. При наличии у человека с группой InV(1,2,—3) ближайшего родственника с группой InV(—1,—2,—3) (единственно возможная генотипиче-

ская комбинация InV/InV!) четко диагностируется его единственно возможная генотипическая комбинация $InV^{1,2}/InV$ и исключаются генотипические комбинации $InV^{1}/InV^{1,2}$ и $InV^{1,2}/InV^{1,2}$. Если, например, у человека с фенотипом InV(1,2—3) отец и мать имеют фенотип InV(1,2,3) (единственно возможный генотип $InV^{1,2}/InV^{3}$!), то этим доказывается наличие у него гомозиготного генотипа $InV^{1,2}/InV^{1,2}$ и исключается возможность генотипических комбинаций $InV^{1}/InV^{1,2}$ и $InV^{1,2}/InV$.

Таким образом, комплексное исследование тремя антисыворотками [анти-InV(1), анти-InV(2) и анти-InV(3) сывороток крови ребенка, его матери и предполагаемого отца, а иногда и ближайших родственников матери и ответчика позволит эксперту выявлять уже не отдельные факторы или фенотипы системы InV, но и генотипические комбинации этой системы. Знание последних значительно повышает достоверность подобной экспертизы и дает возможность объективно решить вопрос о том, может ли ответчик с учетом соответствующих генотипических комбинаций быть отцом конкретного ребенка или же он должен быть исключен в качестве истинного отца этого ребенка.

Вопрос о существовании сывороток анти-InV, выявляющих «эффект дозы», в настоящее время остается открытым. Существование таких сывороток оказало бы неоценимую помощь в диагностике генотипов InV по выявляемым иммуноглобулиновым факторам этой системы. Однако, по нашему мнению, реакция торможения агглютинации сенсибилизированных неполными антителами анти-Rh_0 с определенной InV-специфичностью эритроцитов является слишком уж опосредованной серологической реакцией. Поэтому обнаружение таких антисывороток анти-InV, по-видимому, маловероятно.

Использование генетически полиморфной иммуноглобулиновой системы InV в судебно-медицинских экспертизах, проводимых в связи со спорным происхождением ребенка, значительно повышает их достоверность. Так, по данным H. Ritter и соавт. (1965), исследование даже одного только фактора IVn(1) этой системы позволит эксперту в 6% случаев исключить отцовство лиц, ложно указанных в качестве отца того или иного ребенка. А исследование даже одного фактора InV(a) [InV(2)] также является весьма информативным. Так, исключение отцовства по этому фактору имело место в 21 из 820 дел, при-

чем в 10 случаях оказалось единственным доказательством по делу.

R. Chakrraborty и соавт. (1974) приводят сводные данные о процентной вероятности исключения отцовства по иммуноглобулиновой системе InV (с учетом всех трех ее сывороточных факторов) для трех расовых групп. Согласно этим данным, наибольшая вероятность исключения отцовства по сывороточным факторам системы InV приходится на негроидные популяции — 23,66%, на монголоидные популяции — 16,64%, а среди европеоидов она составляет всего 6,1%. Учитывая исключительно разнообразный в национальном отношении состав населения нашей страны, можно смело утверждать, что суммарная процентная вероятность исключения отцовства по генотипическим комбинациям системы InV (а не по отдельным ее факторам или фенотипам) будет гораздо выше.

Глава 12

СИСТЕМА ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА (Gc)

В 1959 г. J. Hirschfeld с помощью иммуноэлектрофореза в агаровом геле при использовании имммунной антисыворотки, преципитирующей белки человека, обнаружил в зоне α_2-глобулинов новый протеин, названный им группоспецифическим компонентом Gc. При этом автор наблюдал либо быстро мигрирующую, либо медленно мигрирующую дугу преципитации, либо общую слитую дугу. Быстро мигрирующий белок группоспецифического компонента был обозначен Gc1, а медленно мигрирующий — Gc2.

Автор выдвинул гипотезу, согласно которой полиморфизм системы Gc контролируется двумя аутосомальными кодоминантными аллелями Gc^1 и Gc^2 в едином генном локусе без доминирования. При этом аллель Gc^1 ответственен за образование белка Gc1, а аллель Gc^2 — за образование белка Gc2. Из этого вытекает, что существуют три группы, или типа Gc: Gc1—1 (содержит только быстро мигрирующий белок Gc1), Gc2—2 (содержит только медленно мигрирующий белок Gc2) и Gc2—1 (содержит оба белка Gc1 и Gc2) (рис. 7).

Методик и различных модификаций иммуноэлектрофоретического выявления групп системы Gc предложено много. Мы остановимся лишь на классическом методе — иммуноэлектрофорезе в агаровом геле (по Hirschfeld, 1960).

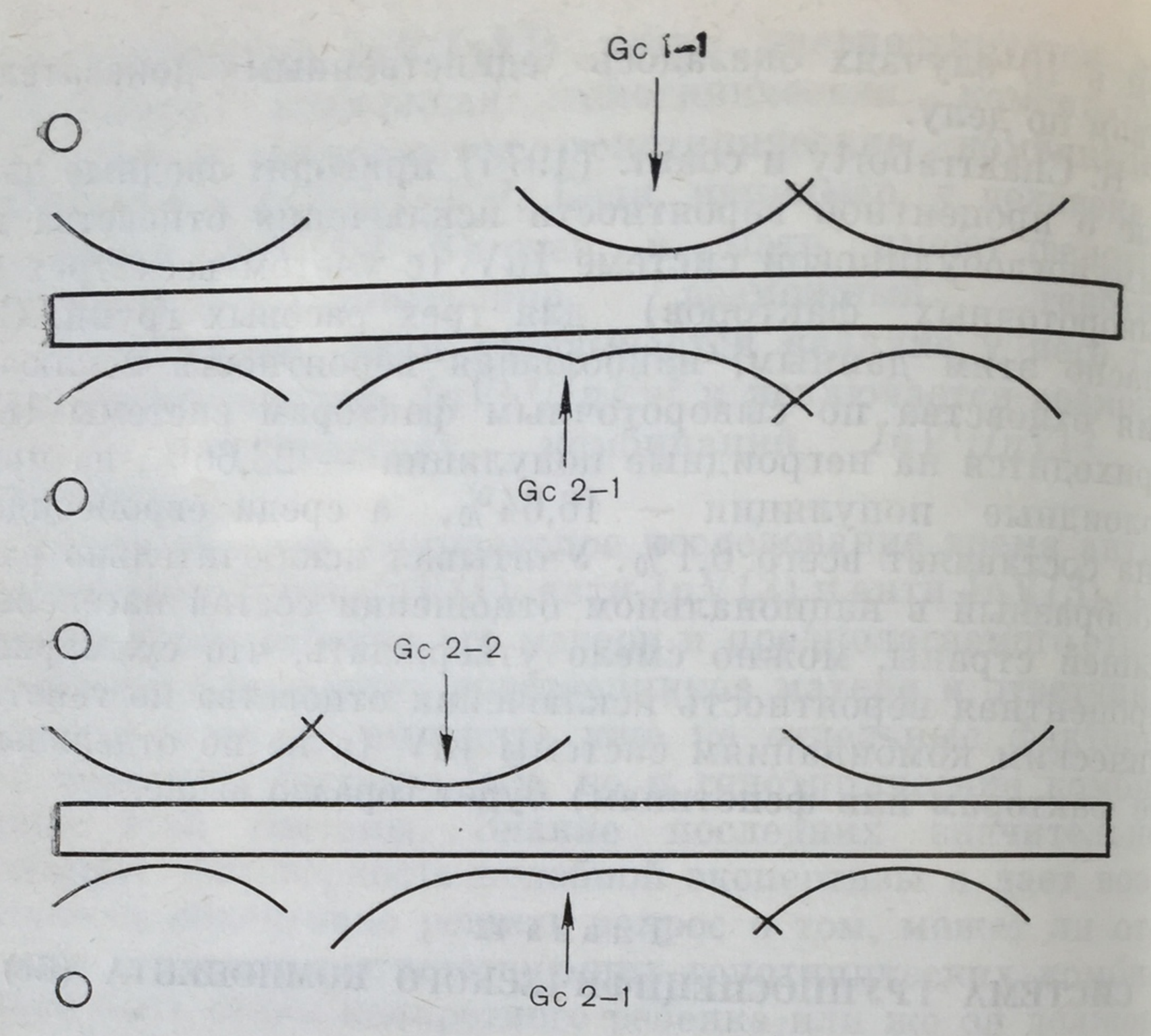


Рис. 7. Схематическое изображение дуг преципитации Gc в фенотипах Gc1-1, Gc2-2 и Gc2-1 после иммуноэлектрофоретического исследования.

Буферная система Hirschfeld включает электродный и гелевый буфер. Электродный буфер готовят из 6,9 г веронала, 43,8 г мединала, 1,92 г лактата кальция, до 5 л дистиллированной воды. Гелевый буфер состоит из 3,32 г веронала, 21,02 г мединала, 3,07 г лактата кальция, до 2 л дистиллированной воды. Для получения 1—1,5% агарового геля агар специальной очистки (например, агар Difco, Kobe-Agar 1 и др.) растворяют в водяной бане с разведенным гелевым буфером до концентрации агара 1—1,5%. Смесь выливают на стеклянную пластинку размером 13×18 мм (на одну пластинку требуется около 50 мл расплавленного агара). После застывания в геле вырезают стартовые лунки и каналы для иммунных осаждающих белки человека антисывороток или же для моновалентных иммунных сывороток анти-Gc.

Электрофорез проводят при напряжении 7—8 В/см в течение 2—2½ ч. После проведения электрофореза каналы заполняют иммунной сывороткой анти-Gc и пластинки помещают во влажных камерах в термостат при +37 °С на 20 ч. За это время антисыворотки диффундируют в гель и образуют зоны преципитации. После проведения иммунной диффузии агаровые пластинки промывают от избытка белка изотоническим раствором NaCl или дистиллированной водой, затем высушивают и окрашивают 5 мин в красителе следующего состава: 1 часть уксусной кислоты, 5 частей метилового спирта, 5 частей дистиллированной воды. На 100 мл этой

смеси добавляют 100 мг амидошварца 10В. После окрашивания пластинку обесцвечивают в том же растворе, но без амидошварца 10В.

Линия преципитации белка Gc расположена вблизи канала. Распознавание линий Gc значительно облегчается при сравнении иммуноэлектрофореграммы с результатами контрольных исследований сывороток с заведомо известными типами Gc. Трудности определения линий преципитации Gc привели к необходимости получения специфичных моновалентных антисывороток анти-Gc, с помощью которых четко выявляются все три группы протеина.

Частота встречаемости аллеля Gc^1 среди населения Земного шара превышает частоту встречаемости аллеля Gc^2 и составляет в среднем для европеоидов 60—65%, для монголоидов 75—80% и для негроидов 90—95%. Результаты посемейных обследований свидетельствуют о том, что имеются бесспорные исключения из общепризнанного порядка наследования групп системы Gc, обусловленные, по-видимому, действием каких-то редких атипичных аллелей в генном локусе этой системы.

T. Reinskou (1963) обнаружил, что быстромигрирующий компонент Gc является гетерогенным: при пролонгированном иммуноэлектрофорезе образуются две дуги преципитации Gc1—1 и три дуги Gc2—1. Поскольку все исследованные сыворотки типа Gc1—1 и Gc2—1 давали такую картину, автор сделал вывод о том, что белок Gc1 состоит из двух протеинов Gc1F и Gc1S, генетическая реализация которых обусловлена аллелем Gc^1. J. Hirschfeld (1962) описал генетически обусловленные варианты белков Gc, названные им белками GcX и GcY. В последующем были обнаружены и другие варианты Gc: Gc Aborigene (GcAb); GcZ; GcBangkok (GcBkk); Gc Darmstadt (GcD); Gc Japan (GcJ); Gc Wien (GcW); Gc Opava (GcOp).

Все эти так называемые особые формы белков Gc довольно редки, однако судебно-медицинский эксперт, использующий генетически обусловленный полиморфизм системы Gc для решения вопросов, связанных со спорным происхождением ребенка, конечно же, должен знать об их существовании. Обнаружение какого-либо редкого атипичного варианта Gc у ребенка и его предполагаемого отца свидетельствует о том, что ответчик является действительным отцом ребенка. Для более точного дифференцирования атипичных вариантов системы Gc от нормальных типов при использовании иммуноэлектрофореза многие

авторы рекомендуют либо применять более продолжительный иммуноэлектрофорез с обычной техникой, либо использовать так называемый перекрестный иммуноэлектрофорез по C. Laurell (1965) в модификации H. Cleve и соавт. (1970).

Для этого по окончании обычного электрофоретического разделения из стартовых лунок удаляют остатки исследуемых сывороток, а в каналы (после удаления из них агара) помещают преципитирующую сыворотку анти-Gc. Затем агаровую пластинку поворачивают на 90° и полоски фильтровальной бумаги, соединяющие агаровый гель с переходным буфером, располагают в следующем порядке: бумагу анода кладут со стороны канала для преципитирующих антисывороток, а бумагу катода — со стороны разделенных фракций исследуемой сыворотки вдоль оси электрофоретического разделения белков. Естественно, что перед проведением электрофореза все стартовые лунки в агаре располагают только по одну сторону от каналов. После этого включают ток с напряжением в 2 раза меньшим, чем при начальном электрофоретическом разделении. При таком приложении электрического поля глобулины исследуемой сыворотки крови будут двигаться к аноду, т. е. к каналу с преципитирующей антисывороткой, а γ-глобулины преципитирующей антисыворотки, которые главным образом и участвуют в образовании преципитатов, — в сторону катода, т. е. навстречу α_2-глобулинам исследуемой сыворотки. В этом случае линии преципитации образуются уже через 3—4 ч и по ним можно довольно легко отличить атипичный вариант Gc от обычных типов этого белка.

Редкие находки атипичных вариантов Gc, которые передаются по наследству, безусловно, свидетельствуют о том, что в генном локусе системы Gc, помимо основных аллелей Gc^1 и Gc^2, могут находиться, по-видимому, и другие редкие аллели (Gc^X, Gc^Y, Gc^{Ab}, Gc^Z и др.).

Система Gc уже давно практически применяется в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства, поскольку четкий аутосомальный кодоминантный порядок наследования ее групповых факторов позволяет эксперту с учетом фенотипов Gc ответчика, ребенка и его матери решать вопрос о возможности или невозможности рождения ребенка от определенной родительской пары. От частоты встречаемости типов Gc среди различных популяций зависит максимальная вероятность исключения ложно указанного в качестве отца ребенка мужчины с учетом только этой генетической системы. Так, по данным T. Reinskou (1965), из 1338 дел о спорном отцовстве в 116 наблюдалось исключение мужчин в качестве отца ребенка по системе Gc. Суммарная вероятность исключения отцовства по системе Gc с учетом двух аллелей Gc^1 и Gc^2

составляет соответственно для негроидных, европеоидных и монголоидных популяций 7,31, 16,61 и 15,60%.

K. Henningsen (1966) сообщил об одном случае, когда мать обладала фенотипом Gc2—2, а ее ребенок — Gc1—1, т. е. по всем законам наследования групп Gc исключалась возможность рождения ребенка с такой группой Gc данной женщиной. Возможность замены или перепутывания ребенка при рождении в этом случае полностью исключалась. Было установлено, что отец матери имеет фенотип Gc1—1, следовательно, в сыворотке крови этой женщины должен бы находиться гликопротеиновый компонент Gc1. Однако его не было, поэтому единственно возможным объяснением этого генетического феномена является предположение о наследственной передаче в этой семье какого-то «немого» аллеля Gc^0, который не обеспечивает генетическую реализацию соответствующего гликопротеина Gc и тем самым может создать иллюзию противоположной гомозиготности. Это может привести к ошибочному заключению о невозможности рождения ребенка от конкретного лица, которое в действительности является родителем данного ребенка. Отец же матери ребенка был генотипически гетерозиготным по обычному аллелю Gc^1 и крайне редкому аллелю Gc^0, хотя фенотипически он характеризовался группой крови Gc1—1 (т. е. якобы генотипической гомозиготой Gc^1/Gc^1). Мать ребенка унаследовала от отца аллель Gc^0, а от своей матери — обычный аллель Gc^2 (ее фенотип Gc2—2), т. е. также была генотипически гетерозиготной Gc^0/Gc^2, хотя фенотипически имела группу Gc2—2 (т. е. якобы генотипически гомозиготной Gc^2/Gc^2). Своему ребенку мать также передала аллель Gc^0, поэтому ее ребенок также был генотипически гетерозиготным Gc^0/Gc^1 (обычный аллель Gc^1 ребенок унаследовал от своего отца — мужа матери), хотя опять же фенотипически характеризовался группой Gc1—1, т. е. был генотипически гомозиготным Gc^1/Gc^1. Правильность предположения о существовании аллеля Gc^0, чрезвычайно «опасного» для судебно-медицинских экспертов, K. Heinningsen доказал количественным исследованием содержания гликопротеинов Gc в сыворотке крови ребенка, его матери и его дедушки по матери. Как и ожидалось, у всех них оно составило приблизительно 50% от нормального содержания гликопротеинов Gc в сыворотке крови человека.

О подобных наблюдениях сообщили O. Prokop и A. Rackwitz (1968). Авторы обнаружили семью, в трех

поколениях которой также наблюдалась противоположная «гомозиготность» по системе Gc сначала у матери и ее сына, а в дальнейшем у ставшего уже отцом сына и у его дочери. Так же как и K. Henningsen, эти авторы считают, что такой генетический феномен доказывает существование в генном локусе системы Gc крайне редкого «немого» аллеля Gc^0, антигенно не реализующего субстанцию Gc и который в гетерозиготной форме с одним из основных аллелей Gc^1 или Gc^2 создает фенотипическую иллюзию генотипической гомозиготности по соответствующему алллелю. О том, что аллель Gc^0 крайне редок, безусловно, свидетельствует тот факт, что до настоящего времени (за 20 лет многочисленных исследований факторов Gc среди населения Земного шара) ни разу не встретился человек, генотипически гомозиготный по этому аллелю и в сыворотке крови которого белок Gc вообще бы отсутствовал.

Хотя этот факт и должен всегда учитываться судебно-медицинскими экспертами (особенно в случаях исключения отцовства или материнства по противоположной гомозиготности системы Gc у ответчика и ребенка или же у матери и ее ребенка), однако, по мнению O. Prokop и W. Göhler (1976), крайняя редкость аллеля Gc^0 позволяет все же эксперту в таких случаях говорить о том, что «отцовство (или материнство) в данном случае невозможно». Соглашаясь в принципе с мнением авторов, мы все же считаем необходимым в таких случаях проводить обязательное исследование типов Gc у всех ближайших родственников, проходящих по делу лиц (их родителей, братьев и сестер) для выяснения их истинных генотипов по этой системе, а также в случаях необходимости проводить количественный учет содержания белков Gc в сыворотке крови ребенка и «исключившегося» ответчика или «исключившейся» матери ребенка.

Уже отмечалось, что бурное развитие техники, появление принципиально новых аналитических методов исследования с исключительно высокой разрешающей способностью вызвало в буквальном смысле слова переворот в, казалось бы, уже сложившихся представлениях о генетических маркерах крови человека и об их наследственной передаче. Поясним эту мысль на примере системы Gc.

При пролонгированном иммуноэлектрофорезе T. Reinskou (1963) впервые наблюдал разделение белка Gc1 на две фракции Gc1F и Gc1S. Поскольку все исследованные

сыворотки с типами Gc1-1 и Gc2-1 давали одинаковую картину, автору пришлось отказаться от мысли о какой-либо генетической полиморфности этих компонентов Gc и предположить, что аллель Gc^1 управляет генетической реализацией как белка Gc1F, так и Gc1S. Исследования, проведенные группой ученых во главе с A. Rouslahti (1971), подтвердили правильность генетической гипотезы T. Reinskou.

Многочисленные популяционно-генетические исследования групп Gc, семейные обследования, обследования многочисленных пар мать — ребенок и однояйцевых близнецов, проводимые в течение почти 20 лет методом иммуноэлектрофореза с использованием моновалентных сывороток анти-Gc или другими электрофоретическими методами, подтверждали правильность гипотезы J. Hirschfeld о простом аутосомальном порядке наследования групп системы Gc, управляемом двумя основными аллелями Gc^1 и Gc^2 в едином генном локусе *Gc* без доминирования. Признавалось также, что в генном локусе этой системы находятся, по-видимому, чрезвычайно редкие «атипичные» аллели Gc^{Ab}, Gc^{W}, Gc^{D}, Gc^{Y}, Gc^{Op}, Gc^{X}, Gc^{Bkk}, Gc^{0}, Gc^{Z} и другие, которые в гетерозиготной форме с основными аллелями Gc^1 или Gc^2 генетически обусловливают появление особых атипичных, или «вариантных», групп Gc, передающихся по наследству. Однако J. Constans и M. Viau (1977) с помощью разработанного ими нового метода иммунной фиксации после изоэлектрического фокусирования смогли доказать генетически обусловленную гетерогенность быстромигрирующих белков Gc, считавшихся ранее генетическим продуктом единого аллеля Gc^1.

Изоэлектрическое фокусирование в полиакриламидном геле проводили на приборе «Мультифор-ЛКБ». В качестве амфолинов для пластинок полиакриламидного геля использовали: на катоде 0,2 M NaOH, на аноде 1 M H_3PO_4. Изоэлектрическое фокусирование по градиенту в пределах pH 4,0—6,5 проводили 4,5 ч с использованием стабилизированного тока мощностью 15 В. Начальное напряжение тока составляло 500 В, спустя 30 мин после начала изоэлектрического фокусирования его повышали до 1200 В. Пластинки охлаждали циркулирующей струей воды при температуре 12 °С. Затем проводили иммунную фиксацию белков Gc. Для этого полоски ацетатцеллюлозы смачивали иммунной моновалентной сывороткой анти-Gc и осторожно накладывали их на 2—3 мин на соответствующие (для белков Gc) участки пластинок. После этого полоски ацетатцеллюлозы удаляли и пластинки промывали в течение 10 ч в сосуде с циркулирующей и проточной водой для вымывания всех остальных, иммунологически не связавшихся сыворо-

точных белков, кроме «фиксированных» белков Gc. Затем пластинки окрашивали 0,5% раствором кумасси блю (Coomassie Brilliant Blue R-250) в смеси метанол — ледяная уксусная кислота — дистиллированная вода в соотношении 50:1:49. Обесцвечивание производили в этом же растворе без добавления красителя.

С помощью такого метода J. Constans и M. Viau обнаружили, что быстромигрирующие пары, или компоненты, белков Gc1 неодинаковы в различных образцах сывороток с типом Gc1-1 и Gc2-1 (вспомним совершенно одинаковое иммуноэлектрофоретическое «раздвоение» белков Gc1F и Gc1S). Они мигрируют либо несколько быстрее, либо медленнее. Первые же семейные обследования, проведенные J. Constans и M. Viau, убедительно свидетельствовали о том, что наблюдаемая ими различная миграция быстрых белков Gc1 в образцах сывороток крови Gc1-1 и Gc2-1 генетически обусловлена.

Таким образом, спустя почти 20 лет с момента открытия J. Hirschfeld (1959) генетически обусловленного полиморфизма системы Gc было доказано, что эта система контролируется не двумя основными аллелями Gc^1 и Gc^2 в едином генном локусе этой системы, а тремя основными аллелями Gc^{1S}, Gc^{1F} и Gc^2. Поскольку система Gc оказалась трехаллельной генетической системой, то ее полиморфизм возрос вдвое и можно всех людей подразделять не на три основные группы или фенотипа, а на шесть групп, каждой из которых соответствует единственно возможная генотипическая комбинация. Это представляет исключительную ценность для судебно-медицинских экспертов, использующих полиморфизм этой сывороточной системы в экспертизах спорного отцовства. Шесть возможных генотипических комбинаций системы Gc соответствуют следующим шести ее фенотипам.

Генотип	*Фенотип*
Gc^{1F}/Gc^{1F}	*Gc1F-1F*
Gc^{1F}/Gc^{1S}	*Gc1F-1S*
Gc^{1F}/Gc^{2}	*Gc2-1F*
Gc^{1S}/Gc^{1S}	*Gc1S-1S*
Gc^{1S}/Gc^{2}	*Gc2-1S*
Gc^{2}/Gc^{2}	*Gc2-2*

H. Cleve и соавт. (1978) провели генетический анализ подтипов системы Gc среди 93 семей с 176 детьми, который полностью подтвердил правильность трехаллельной генетической модели наследования групп Gc с шестью ее фенотипами. Изученный ими материал включал и 13 так

называемых «критических» родительских пар по системе Gc (одну 1F-1F×1S-1S, восемь 1S-1S×1S-1S и четыре 1S-1S×2-2). Все 18 детей, родившиеся в этих семьях, обладали единственно возможными фенотипами Gc с учетом подгрупп этой системы у их родителей: соответственно 1F-1S (один ребенок), 1S-1S (10 детей) и 2-1S (7 детей). Авторы определили частоту встречаемости трех основных аллелей системы Gc среди европейского населения: Gc^{1F} 14,7%, Gc^{1S} 59,2%, Gc^{2} 26,1%. Отмечено, что после внедрения метода иммунной фиксации с изоэлектрическим фокусированием в популяционно-генетических исследованиях полиморфизма системы Gc частота встречаемости редких, или «атипичных», вариантов Gc оказалась неожиданно высокой при сравнении с прежними результатами исследований, проводимых с помощью различных иммуноэлектрофоретических и электрофоретических методов.

Использование в экспертизах спорного отцовства подтипов системы Gc, вернее, всех шести ее основных фенотипов, четко отражающих единственно возможные для каждого фенотипа генотипические комбинации, значительно повышает как информативность этой системы, так и вероятность исключения мужчин, ложно указанных в качестве отца ребенка. Если, например, теоретически вероятность исключения отцовства по системе Gc с учетом двухаллельной модели наследования ее групп составила 15,58%, то при учете шести фенотипов число возможных исключений ответчиков значительно возрастает — до 29,36%.

Необходимо упомянуть и о новейшем неиммунологическом методе выявления Gc-преципитатов после изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле. Этот метод разработал B. Hoste (1979). Метод, по-видимому, является чрезвычайно перспективным, поскольку он простой, быстрый и высокочувствительный. Главное его преимущество заключается в том, что он не требует дорогостоящей моновалентной сыворотки анти-Gc, фиксирующей преципитаты Gc после изоэлектрического фокусирования сывороток на пластинках.

Сразу же после окончания изоэлектрического фокусирования пластинки с полиакриламидным гелем обрабатывают раствором, содержащим 330 мл метанола, 660 мл дистиллированной воды, 3 г сульфосалициловой кислоты (3% раствор) и 1 г красителя кумасси блю. Полосы Gc появляются немедленно после обработки (бе-

лые преципитаты, которые лучше всего просматриваются на темном фоне в проходящем свете). Все другие белковые фракции (в том числе трансферрин, α_1-антитрипсин) проявлялись в виде полос голубого цвета через 1—2 ч после инкубации пластинок в растворе красителя при 50 °С.

Сравнительное параллельное исследование многочисленных образцов сывороток крови с различными подтипами Gc, а также с его редкими атипичными вариантами показало полную идентичность Gc-преципитатов, выявляемых как методом иммунной фиксации антителами анти-Gc, так и сульфосалициловым методом. Сульфосалициловый метод основан на физико-химических свойствах белка Gc — самого термонестабильного сывороточного белка. Сульфосалициловая кислота, так же как и многие другие кислоты, осаждает большинство сывороточных белков крови человека, однако в низкой концентрации (3%) осаждает в первую очередь гликопротеины группоспецифического компонента Gc. Учет результатов (выявление локализации и фотографирование преципитатов Gc) реакции должен быть быстрым, поскольку в дальнейшем могут проявляться (осаждаться 3% сульфосалициловой кислотой) и другие белковые фракции.

В 1978 г. в Париже состоялся первый международный рабочий конгресс, посвященный обсуждению новейших достижений в области биохимии, функции и генетически обусловленной полиморфности групповых специфических компонентов сыворотки крови человека. На нем были рассмотрены все иммунологические и разделительные методы, используемые в настоящее время при изучении генетически обусловленного полиморфизма системы Gc. Из них рекомендованы следующие: 1) метод изоэлектрофокусирования на полиакриламидных пластинках с последующей иммунной фиксацией по J. Constans и M. Viau (1977); 2) метод электрофореза в геле агарозы по A. M. Johnson и соавт. (1975); 3) метод электрофореза в 8,5% полиакриламидном геле по F. D. Kitchin (1965). Любопытно, что для изучения полиморфизма системы Gc конгресс не рекомендовал использовать классический иммуноэлектрофоретический метод, при помощи которого и был открыт генетический полиморфизм этой сывороточной системы.

Были рекомендованы также следующие методы выявления групповых компонентов Gc-протеинов. 1. Методы окраски красителем кумасси блю и амидошварцем

10В. Отмечено, что эти способы не всегда дают возможность проводить прямое определение фенотипов Gc, поэтому конгресс рекомендовал пользоваться предпочтительнее техникой специфического иммунологического исследования, которая является обязательной после изоэлектрофокусирования. Однако в 1978 г. еще не был известен метод сульфосалициловой фиксации. 2. Метод двумерного антиген-антитело перекрестного гелевого электрофореза и иммунофиксирующего гелевого электрофореза по C. Laurell (1965). Главным недостатком метода является незначительное различие электрофоретической подвижности групповых преципитатов Gc, затрудняющее диагностику групп Gc. Конгресс рекомендовал в данном случае использовать метод иммунной преципитации на поверхности геля. 3. Метод иммунопреципитации на ацетатцеллюлозе.

Ацетатцеллюлозные мембраны перед исследованием пропитывают моновалентной преципитирующей сывороткой анти-Gc, разведенной в зависимости от ее первоначального титра изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:2—1:10. Затем мембраны 2 ч просушивают на воздухе и после электрофоретического разделения на 1—2 мин накладывают на поверхность геля. Затем их снимают и 4 ч промывают в проточной воде, после чего иммунные преципитаты Gc окрашиваются красителем кумасси блю или амидошварцем 10В.

Метод иммунопреципитации на ацетатцеллюлозе в принципе очень похож на метод иммунной фиксации, который применяют после изоэлектрического фокусирования для выявления групповых преципитатов Gc. Отличие заключается лишь в том, что при иммунопреципитации от избытка сывороточных белков, не относящихся к Gc-протеинам, отмывается после контакта с поверхностью геля пропитанная сывороткой анти-Gc ацетатцеллюлозная мембрана, на которой впоследствии и выявляют при окрашивании групповые Gc-преципитаты. При иммунной фиксации от посторонних сывороточных белков отмывают гель, на котором и выявляют Gc при последующем окрашивании.

На конгрессе была принята новая номенклатура системы Gc, относящаяся главным образом ко всем ранее описанным «антипичным» вариантам. Эта номенклатура довольно сложна. Все аллели системы Gc, антигенно реализующие соответствующие фенотипы Gc, разделены на две основные категории: аллели, обусловливающие появление двойных полипептидных цепей Gc (или компонентов Gc), и аллели, ответственные за образование только одиночных полипептидных цепей (или компонентов) Gc. Такое под-

разделение основано на электрофоретической или изоэлектрофокусической картине всех фенотипов системы Gc, причем новая номенклатура построена на учете характера миграции каждого компонента Gc в том или ином фенотипе.

Поскольку известно, что два основных «подаллеля» Gc^{1}—Gc^{1F} и Gc^{1S} ответственны за образование двух соответствующих белков Gc (двух Gc-полипептидных цепей, или двух Gc-компонентов), а аллель Gc^{2} — за появление одного белка Gc (одного Gc-компонента, или одной полипептидной цепи Gc), то конгресс счел возможным присвоить всем аллелям системы Gc, антигенно реализующим появление двух соответствующих протеинов, начальную цифру 1, которую ставят слева от нового буквенно-цифрового обозначения соответствующего аллеля. Всем аллелям системы Gc, ответственным за появление только одного белка Gc (наподобие аллеля Gc^{2}), присваивается начальная цифра 2, также ставящаяся слева от буквенно-цифрового обозначения соответствующего аллеля.

Необходимо также отметить, что новая номенклатура системы Gc сохраняет для трех основных аллелей этой системы их прежние наименования: 1F, 1S и 2. Для всех же редких атипичных аллелей системы Gc для их систематизации, дифференцирования или установления тождества между некоторыми из этих аллелей вводится новая международная номенклатура, прежде всего учитывающая миграцию антигенно реализованных этими аллелями Gc-протеинов, наблюдаемую после изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле.

При этом учитывается расположение — анодное (A) или катодное (C) — этих «вариантных» компонентов Gc по отношению к основным Gc-протеинам, появление которых обусловлено действием основных аллелей Gc^{1F}, Gc^{1S} и Gc^{2}.

Третья цифра, ставящаяся после букв A или C, характеризует степень удаления (к аноду или катоду) этих атипичных белков Gc по отношению к компонентам Gc обычного гомозиготного фенотипа Gc1S-1S.

Так, старое обозначение атипичного аллеля Gc^{1Ab}, ответственного за появление редкого фенотипа Gc (Aborigine, Australia или сокращенно *GcAb*), по новой международной номенклатуре заменено на Gc^{1A1}. Это значит, что данный аллель является генетическим вариантом аллеля Gc^{1}, последний ответствен за появление двух полипептидных цепей, или компонентов Gc, мигрирующих при изоэлектрофокусировании несколько быстрее компонентов Gc,

контролируемых обычным аллелем Gc^{1S} (в фенотипе Gc1S—1S). Тот же принцип классификации применен и к мутационным вариантам аллеля Gc^{2}. Любой атипичный белок Gc, мигрирующий несколько быстрее обычного протеина Gc^{2} в фенотипе Gc2-2, и атипичный аллель, антигенно его реализующий, обозначают Gc^{2A1}, Gc^{2A2} и т. д.

Путем сравнительного исследования идентифицировано 29 различных белков Gc, каждому из которых в генном локусе соответствует определенный аллель. В соответствии с уменьшающейся электроподвижностью они обозначены: 1A9, 1A8, 1A7, 1A6, 1A5, 1A4, 1A3, 1A2, 1F, 1A1, 1S, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1C5, 1C6, 1C7, 1C8, 1C9, 1C10, 2A6, 2A5, 2A4, 2A3, 2A2, 2A1, 2, 2C1 и 2C2.

Частота встречаемости аллелей Gc^{1F}, Gc^{1S}, Gc^{2} во много раз превышает частоту встречаемости 26 других атипичных аллелей, однако такое большое их число делает вполне вероятным нахождение атипичных гетерозиготных фенотипов у проходящих по делу лиц. При этом определение, например, в сыворотке крови ребенка и его предполагаемого отца одних и тех же атипичных фенотипов с большой вероятностью свидетельствует о том, что данный мужчина является истинным отцом ребенка.

Таким образом, сывороточная система Gc при внедрении в экспертную практику высокочувствительных разделительных аналитических методов исследования сможет стать весьма информативной при решении судебно-медицинских вопросов, связанных со спорным происхождением ребенка. Любая возможная изоэлектрофокусическая фореграмма Gc-протеинов четко отражает не только фенотип, но и единственно возможный для этого фенотипа генотипический набор индивида, на основании которого и решается вопрос о возможности рождения ребенка от определенной родительской пары.

Глава 13
СИСТЕМЫ ЛИПОПРОТЕИНОВ

К настоящему времени выделены и достаточно изучены три липопротеиновые системы Ag, Lp и Ld, из которых наибольший интерес для судебно-медицинских экспертов представляет, безусловно, система Ag, достоверно демонстрирующая независимый от других изосерологических и сывороточных систем крови человека генетически обусловленный аллотипический полиморфизм β-липопротеинов.

Система Ag

Система Ag была открыта в 1961 г., когда A. C. Allison и B. S. Blumberg обнаружили в сыворотке крови пациента, перенесшего многократные переливания крови, необычное преципитирующее изоиммунное антитело, которое являлось изопреципитином. Это антитело в агаровогелевом двойном диффузионном тесте по Оухтерлони реагировало приблизительно с 58% образцов сывороток крови белых американцев, открывая в них какой-то новый, не связанный ни с одной из известных сывороточных систем генетически обусловленный полиморфизм. Нормальные сыворотки, дающие положительный результат реакции преципитации с этим необычным изопреципитином, стали обозначать Ag(a), т. е. содержащие, как ошибочно считали ранее, α-глобулиновый антиген. Изопреципитиновые антитела соответственно получили обозначение анти-Ag(a).

B. S. Blumberg (1962) установил липидную природу антигена Ag(a) и дифференцировал его как β-липопротеин низкой плотности, поскольку преципитаты, образующиеся в тесте Ouchterlony под воздействием изопреципитина анти-Ag(a), не окрашивались амидошварцем, но хорошо окрашивались специфичными для липидов красителями (судановым, шарлах красным). Первые же семейные обследования показали, что антиген Ag(a) является аутосомальным генетически обусловленным признаком, передающимся по наследству. В дальнейшем в сыворотках крови больных, подвергавшихся многократным гемотрансфузиям, обнаружили новые изопреципитины по отношению к β-липопротеинам, однако с новой [по сравнению с первоначальной у анти-Ag(a)] серологической направленностью [Blumberg B. S., Riddell N. M., 1963, и др.]. Оказалось, что антитело анти-Ag(a) состоит из смеси нескольких антител: анти-Ag(a_1), анти-Ag(x) и анти-Ag(z). В дальнейшем были идентифицированы и другие антигенные детерминанты системы Ag, обозначенные антигенами Ag(y) и Ag(t).

Большим вкладом в раскрытие генетических взаимосвязей сывороточной липопротеиновой системы Ag, а также в открытие новых антигенов этой системы явилась разработка весьма чувствительного серологического метода пассивной гемагглютинации [Bütler R., Brunner E., 1966], который во многих случаях пришел на смену методу иммунной диффузии в агаровом геле по Оухтерлони.

Эритроциты крови человека группы $0Rh_0$ при 0 °C и ультрацентрифугировании сенсибилизировали в присутствии бисдиазотированного бензидина очищенными β-липопротеинами со специфичностью Ag(a+) и Ag(a—). Для проведения теста гемагглютинации, играющей в данном случае роль поискового теста на соответствующие антитела анти-Ag, сенсибилизированные эритроциты инкубировали с исследуемыми сыворотками 30 мин при 56 °C. Антигены системы Ag выявляли (по аналогии с обнаружением групповых факторов системы Gm методом задержки гемагглютинации, вводя в реакцию сначала соответствующую сыворотку анти-Ag и испытуемую сыворотку и затем добавляя в эту смесь сенсибилизированные β-липопротеинами эритроциты.

R. Bütler и E. Brunner (1969) с помощью открытой ими сыворотки, названной анти-Ag(c), смогли показать, что в природе существуют не только изопреципитины анти-Ag, но и другие, непреципитирующие антитела анти-Ag, проявляющие свою серологическую активность не в иммунодиффузионном тесте по Оухтерлони, а только в тесте пассивной гемагглютинации и подобных серологических реакциях.

К настоящему времени, кроме указанных выше 5 факторов, описаны следующие факторы системы Ag: Ag(c), Ag(m), Ag(g), Ag(d) и Ag(h).

Сформированность липопротеиновой системы Ag к моменту рождения ребенка позволяет использовать ее генетически обусловленный полиморфизм в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства уже на ранних сроках жизни ребенка. Пока еще до конца не выяснены все генетические взаимосвязи этой, по-видимому, очень сложной липопротеиновой системы. Однако многочисленные семейные обследования наследственной передачи групповых антигенов системы Ag свидетельствуют о том, что все дети, родители которых не имели какого-либо антигена этой системы, также не содержали его в сыворотке крови. Поэтому совершенно оправдано использование этой генетически полиморфной сывороточной системы в экспертизах, проводимых по делам о спорном происхождении ребенка.

Фамильные исследования показали также, что антигенный полиморфизм системы Ag управляется кодоминантными аутосомальными генами. Еще неясно, расположены ли все эти гены в одном, едином генном локусе для данной системы или же они находятся в разных, но тесно сцепленных генных локусах. Предполагают, что антиген Ag(y) является генетическим продуктом гена, аллельного

по отношению к гену, контролирующему реализацию антигена Ag(x). Это предположение полностью подтвердилось исследованиями J. Hirschfeld и соавт. (1968).

Кроме первой аллельной пары, или двух аллельных генов Ag^x и Ag^y, были найдены и другие парные аллели в системе Ag. Все это позволило создать современную генетическую концепцию наследования групповых антигенов системы Ag, согласно которой на соответствующих аутосомальных хромосомах располагаются следующие четыре исключительно тесно сцепленные генные локусы системы Ag: $Ag^{a_1/d}$, $Ag^{x/y}$, $Ag^{c/g}$ и $Ag^{t/z}$. Их аллели благодаря тесному сцеплению генных локусов наследуются, по-видимому, гаплотипично, наподобие аллелям генетических систем MNSs, Rh, Gm и HLA [Morganti G. et al., 1972].

Частота встречаемости парных аллелей системы Ag вычислена в выборках населения Швейцарии и составила: для $Ag^{a_1} = 48{,}6\%$, $Ag^x = 20{,}8\%$, $Ag^c = 29{,}7\%$, $Ag^t = 81{,}2\%$, $Ag^d = 51{,}4\%$, $Ag^y = 79{,}2\%$, $Ag^g = 70{,}3\%$ и $Ag^z = 18{,}8\%$.

Комплексная система Ag с ее богатым генетически детерминированным «парноаллельным» полиморфизмом нескольких тесно сцепленных друг с другом генных локусов, вне всякого сомнения, в недалеком будущем станет одной из самых перспективных сывороточных систем (наряду с системами Gm, Gc и Hp), используемых в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства.

В настоящее время из-за трудности получения антисывороток на многие антигены системы Ag и относительной легкости получения изоиммунных сывороток анти-Ag(x) и анти-Ag(y) последние два антигена уже применяются в экспертизах спорного происхождения ребенка. Так, по данным J. Hirschfeld и соавт. (1968), при использовании в таких экспертизах только одного фактора Ag(x) вероятность исключения мужчин, не являющихся биологическими отцами конкретных детей, составляет 8,15%. Если же в сыворотке крови проходящих по делу лиц выявлять не один фактор Ag(x), а и второй антитетический к нему фактор Ag(y), то вероятность исключения мужчин, ложно указанных в качестве отцов, повысится почти в 2 раза и достигнет величины 14,2%. Антигены Ag(x) и Ag(y) были исследованы этими авторами в 293 экспертизах спорного отцовства с привлечением по делу 332 мужчин, фигурирующих в качестве предполагаемых отцов; 18 из них были исключены как возможные

отцы благодаря совместному выявлению в сыворотке крови проходящих по делу лиц указанных антигенов.

Разница в процентных показателях исключения заведомых «неотцов» по одному антигену Ag(x) или по двум антигенам Ag(x) и Ag(y) отражает качественно новый уровень проведения экспертиз спорного отцовства, при котором решающее значение для решения вопроса о возможности или невозможности рождения ребенка от определенной родительской пары играют не отдельные групповые факторы крови, а их гаплотипический и генотипический набор.

Благодаря знаниям генетических взаимосвязей системы Ag и ее «парноаллельного» полиморфизма эксперт должен выявлять не отдельные факторы этой системы, а устанавливать уже генотипические комбинации, в результате чего эффективность экспертизы спорного отцовства значительно повышается.

Действительно, второй тесно сцепленный с тремя другими генными локусами системы Ag локус Ag^{xy} является двуаллельной генетической системой с тремя ее возможными генотипами: двумя гомозиготными Ag^x/Ag^x и Ag^y/Ag^y и одним гетерозиготным Ag^x/Ag^y. При исследовании одной сывороткой анти-Ag(x) эксперт может разделить всех людей на два фенотипа Ag(x+) и Ag(x—). Причем если фенотипу Ag(x—) соответствует единственно возможный генотип Ag^y/Ag^y, то фенотипу Ag(x+) — два возможных генотипа Ag^x/Ag^x и Ag^x/Ag^y. При использовании одной сыворотки анти-Ag(x) при фенотипе Ag(x+) у ребенка, его матери и ответчика отцовство последнего в отношении данного ребенка не может быть исключено, поскольку в этом случае эксперт не знает истинного генотипа ни у одного из проходящих по делу лиц. При параллельном же исследовании сыворотками анти-Ag(x) и анти-Ag(y), открывающими соответствующие антигены, которые являются генетическими продуктами двух антитетических аллельных генов изолированной двуаллельной генетической системы, эксперт точно знает генотипы матери, ребенка и ответчика. При этом возникает возможность исключения ответчика, не являющегося фактическим отцом ребенка, при генотипе Ag^x/Ag^x у него самого и матери ребенка и генотипе Ag^x/Ag^y у ребенка. Именно благодаря распознаванию истинного генотипа при фенотипе Ag(x+) гомозиготного Ag^x/Ag^x или гетерозиготного Ag^x/Ag^y с помощью «противоположной» сыворот-

ки анти-Ag(y) и возрастает вероятность исключения отцовства.

Таким образом, используя полиморфизм липопротеиновой системы Ag в экспертизах спорного отцовства, более эффективны «парные» антитела анти-Ag, которые выявляют антигены, реализующиеся под действием аллелей четырех тесно сцепленных локусов этой системы: анти-Ag(a_1) и анти-Ag(d); анти-Ag(x) и анти-Ag(y); анти-Ag(c) и анти-Ag(g); анти-Ag(t) и анти-Ag(z). С помощью набора перечисленных выше сывороток анти-Ag можно устанавливать точные генотипы по каждой из четырех двуаллельных аутосомольных и кодоминантных систем внутри единой системы Ag.

Учитывая исключительно благоприятную частоту распространения парных аллелей внутри каждого из четырех тесно сцепленных генных локусов этой системы (особенно внутри генного локуса $Ag_{a_1/d}$), можно утверждать, что суммарная вероятность исключения отцовства с учетом генотипов всех четырех генных локусов Ag будет исключительно высокой и составит приблизительно 55—60% (!).

Система Ld

Новая система β-липопротеинов, названная системой Ld, была открыта K. Berg в 1965 г. В сыворотке крови больного гемофилией мальчика, получавшего многократные гемотрансфузии, обнаружен необычный холодовой изопреципитин, который в иммунодиффузионном тесте по Оухтерлони реагировал приблизительно с 42% сывороток крови от 162 здоровых, не связанных родством жителей Осло. Открываемый этим холодовым изопреципитином фактор являлся β-липопротеином и был назван фактором Ld(a). Семейные обследования показали наследственную передачу этого фактора, что свидетельствовало о его генетической обусловленности. Порядок наследования антигена Ld(a) показался аутосомально-доминантным.

Поскольку никакая корреляция между антигеном Ld(a) и другими липопротеиновыми системами (Ag и Lp) не прослеживалась, речь шла о новой генетически обусловленной липопротеиновой системе. Согласно генетической гипотезе наследования антигенов системы Ld, антиген Ld(a) генетически реализуется под действием доминантного аллеля Ld^a, причем в генном локусе системы Ld присутствует, по-видимому, и рецессивный аллель *Ld*, ге-

нетически не реализующий появления антигена Ld(a). Характер наследования антигена Ld(a) был изучен при исследовании 26 «критических» семей с 112 детьми, в которых родители имели фенотип Ld(a—); все дети в этих семьях также имели фенотип Ld(a—).

Фактор Ld(a) системы Ld у населения Земного шара распределяется неравномерно (табл. 17).

Таблица 17

Частота встречаемости фенотипов системы Ld у разных народов
(по Berg K., 1965)

Популяция	Ld (a+)		Ld (a—)		Всего, абс. число
	абс. число	%	абс. число	%	
Норвежцы	69	42,59	93	57,41	162
Итальянцы	107	81,06	25	18,94	132
Негры Вашингтона	62	46,27	72	53,73	134
Негры США	49	28,00	126	72,0	175
Бразильцы	17	41,46	24	58,54	41

Как видно из табл. 17, частота встречаемости аллелей Ld^a и гипотетического антитетического по отношению к нему аллеля *Ld* довольно благоприятна в плане использования системы Ld в судебно-медицинской экспертизе спорного отцовства. Однако при использовании только сыворотки анти-Ld(a) эксперт может исключить ответчика в качестве отца ребенка лишь по фактору Ld(a), а не по генотипам этой системы, поскольку пока еще не найдено антисыворотки анти-Ld, реагирующей на антиген, который является генетическим продуктом антитетического по отношению к аллелю Ld^a аллеля *Ld*. Действительно, исключение ответчика, когда он и мать ребенка имеют фенотип Ld(a—), а ребенок — Ld(a+), очевидно. Но в настоящее время невозможно исключение ответчика по генотипам, когда он и мать ребенка имеют гомозиготный генотип Ld^a/Ld^a, а ребенок — гетерозиготный Ld^a/Ld.

Глава 14

СИСТЕМА ТРАНСФЕРРИНА

Трансферрин (Tf), или сидерофилин, по электрофоретической подвижности относится к β_1-глобулинам.

Впервые полиморфизм сывороточного трансферрина выявил O. Smithies (1957). Большинство людей обладали типом C, но иногда встречались типы B и D. Семейные обследования доказали генетическую обусловленность этих вариантов. Онтогенетически трансферрин формируется рано, поскольку его обнаруживали у плодов на сравнительно ранних стадиях развития. У новорожденных он полностью сформирован.

До последнего времени считали, что у подавляющего большинства людей имеется только один тип трансферрина — TfC, генотипически характеризующийся гомозиготной комбинацией по чрезвычайно распространенному основному аллелю Tf^c в генном локусе этой сывороточной системы; другие же трансферрины, являющиеся гетерозиготной формой по основному аллелю Tf^c и по какому-нибудь атипичному аллелю этой системы, из-за крайней редкости этих атипичных аллелей (особенно у европеоидных популяций) встречаются чрезвычайно редко. Атипичные трансферрины, мигрирующие быстрее, чем TfC чаще наблюдаются у европеоидов, а трансферрины, электрофоретическая подвижность которых меньше чем у TfC, — в негроидных популяциях.

Даже в своей последней монографии «Группы крови человека» (1976) O. Prokop и W. Göhler отмечали, что «поскольку сывороточная система трансферринов мало пригодна для практического применения в судебно-медицинских исследованиях, проводимых в делах о спорном отцовстве, то в европейских странах генетическим взаимосвязям этой системы придается сравнительно небольшое значение». Действительно, атипичные, «вариантные», формы трансферринов, отличные от обычного типа TfC, при исследовании их с помощью электрофореза составляли для большинства европейских популяций очень низкую величину — около 1% и меньше. Естественно, что информативность этой системы для исключения мужчины, ложно указанного в качестве отца ребенка, была крайне низкой. Так, по данным E. Giblett (1962) и A. G. Steinberg, J. Matsumoto (1964), вероятность исключения отцовства по системе Tf с учетом трех аллелей Tf^c, Tf^b и Tf^d составляла: для европеоидов 0,64%, монголоидной популяции 0,79% и для негроидной популяции 4,1%.

P. Kühnl и W. Spielmann (1978), используя метод изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле с последующей иммунной фиксацией, смогли доказать,

что в генном локусе системы Tf находится не один, как полагали ранее, чрезвычайно распространенный обычный аллель Tf^{c}, а два обычных аллеля — Tf^{c1} и Tf^{c2}.

Благодаря этому все ранее относящиеся к типу TfC образцы можно было легко подразделить на три общих фенотипа, характеризовавшихся либо одним быстрым трансферриновым компонентом C, либо одним медленным TfC-компонентом, либо двумя этими компонентами вместе. Три новых фенотипа трансферрина обозначили соответственно TfC1, TfC2, TfC2-1.

Семейные обследования, проведенные рядом авторов, без сомнения, свидетельствовали о генетической обусловленности и наследственной передаче трех фенотипов Tf. На основании полученных данных предложена новая двуаллельная формально-генетическая модель наследования типов сывороточных трансферринов. Согласно этой модели, в едином аутосомальном генном локусе данной системы действуют два обычных, или основных, кодоминантных аллеля Tf^{c1} и Tf^{c}, реализующих появление двух гомозиготных (TfC1, TfC2) и одного гетерозиготного (TfC2-1) фенотипов. На основании исследования фенотипов трансферрина среди 942 не связанных родством жителей ФРГ P. Kühnl и W. Spielmann (1978) вычислили генные частоты встречаемости аллелей *Tf*: для аллеля Tf^{c1} 81,95%, для аллеля Tf^{c2} 17,2%, для аллеля Tf^{b2} 0,64%, для аллеля Tf^{b1-2} 0,05%.

M. Thymann (1978) доказала, что групповую идентификацию различных вариантов трансферринов можно провести не только методом изоэлектрического фокусирования в ПААГ с последующей иммунной фиксацией, но и другими высокочувствительными иммунологическими и разделительными методами, такими, например, как двойная диффузия в 1% геле агарозы и метод перекрестного или двумерного иммуноэлектрофореза. Однако, по мнению автора, наилучшие и, самое главное, воспроизводимые результаты достигаются при использовании метода изоэлектрофокусирования с последующей иммунной фиксацией компонентов трансферрина соответствующей антитрансферриновой сывороткой.

P. Kühnl и соавт. (1979), помимо исследования «подтипов» TfC, изучили наследственную передачу редких аллелей этой системы у 90 лиц, имевших разновидности атипичных аллелей Tf^{b} и Tf^{d}. Все обследованные были гетерозиготными по атипичному аллелю и одному

из основных аллелей Tf^{c1} или Tf^{c2}. На изоэлектрофокусической фореграмме трансферринов 90 гетерозиготных лиц TfCB и TfCD, кроме атипичного трансферринового компонента, выявлялся только один обычный компонент β_1-глобулина, реализующийся под действием одного из основных аллелей Tf^{c1} или Tf^{c2}. Все это свидетельствовало в пользу генетической гипотезы, согласно которой атипичные, «вариантные», гены, являющиеся разновидностями генов Tf^{b} и Tf^{d}, представляют собой, по-видимому, аллели к основным генам Tf^{c1} и Tf^{c2} этой генетической системы. Кроме того, нахождение атипичных гомо- и гетерозиготных вариантов трансферрина, таких как тип TfB2 (генотип Tf^{b2}/Tf^{b2}) или TfB2D2 (генотип Tf^{b2}/Tf^{d2}), не имеющих трансферриновых компонентов в зоне TfC, доказывало существование на соответствующих хромосомах единого генного локуса системы Tf, а не отдельных, тесно сцепленных генных локусов (например, *TfC*, *TfB*, *TfD*) с ди- или более аллельным полиморфизмом. Этим доказывалось также отсутствие комплексного гаплотипичного порядка наследования аллелей системы Tf, как это имеет место в групповых системах MNSs, Rh, Gm, HLA и Ag.

Не прошло и года с тех пор как P. Kühnl и W. Spielmann (1978) с помощью изоэлектрического фокусирования в ПААГ и последующей иммунной фиксации открыли два новых основных аллеля Tf^{c1} и Tf^{c2} в генном локусе системы Tf, как появилось новое сообщение этих же исследователей [Kühnl P., Spielmann W., 1979[о наличии в генном локусе этой системы уже не двух (Tf^{c1} и Tf^{c2}) а трех основных аллелей: Tf^{c1}, Tf^{c2}, и Tf^{c3}. Авторы обнаружили, что трансферриновый компонент, ранее считавшийся генетическим продуктом аллеля Tf^{c1}, по своей изоэлектрической подвижности не является однородным, а подразделяется во многих образцах сывороток крови на два компонента. Один из них по изоэлектрической подвижности полностью совпадает с обычным компонентом TfC1, антигенно реализующимся под действием соответствующего аллеля Tf^{c1}, а другой несколько отличается от компонента TfC1 и изоэлектрическая точка его располагается между изоэлектрическими точками трансферриновых компонентов TfC1 и TfC2.

Исследования проводили на 252 не связанных родством жителях ФРГ, а новая формально-генетическая гипотеза наследования сывороточных трансферринов была проверена (и подтверждена!)

при анализе 25 семей с 51 ребенком. Для изоэлектрического фокусирования использовали ПААГ-пластины размером 245×115×0,4 мм, покрытые тончайшей резиновой пленкой. Для полимеризации полиакриламидного геля (общим объемом 11,52 мл) применяли смесь, состоящую из 2,4 мл 29,1% раствора акриламида (масса/объем), 2,4 мл 0,9% раствора N^1, N^1-метиленбисакриламида (масса/объем), 5,0 мл 20,5% раствора сахарозы (масса/объем), 0,7 мл глицерина, 0,6 мл амфолина, содержащего амфолиты в пределах (pH 5—7), 20 мкл ТЭМЕД (N-тетраметилэтилендиамин) и 0.4 мл 1% раствора персульфата аммония (масса/объем). После 20-минутной полимеризации геля при комнатной температуре на гель непосредственно перед внесением в него проб накладывалась максимальная электрическая нагрузка в течение 30 мин (1800 В, 50 мА, 20 Вт). Неразведенные образцы сывороток крови в количестве 5 мкл помещали на кусочки фильтровальной бумаги размером 5×7 мм в 2,5 см от катодного края геля. Спустя 30 мин после начала изоэлектрофокусирования кусочки бумаги удаляли из геля и фокусирование продолжали в $4^1/_2$ ч. Дальнейшую иммунную фиксацию и окрашивание геля кумасси блю R250 проводили по описанному выше методу P. Kühnl и W. Spielmann (1978).

При pH 4—6,5 амфолитов ПААГ выявление трансферриновых компонентов возможно в двух областях, расположенных как к аноду, так и к катоду от стартовых лунок, однако только в анодной области обнаружен новый полиморфизм компонентов в зоне С. Это позволяет подразделить их на три фракции: TfC1, TfC2 и TfC3. После изоэлектрического фокусирования на ПААГ-пластинах, содержащих амфолиты при pH 3,5—9,5, можно было выявить только три основных фенотипа трансферрина: TfC1, TfC2-1 и TfC2 [Kühnl P., Spielmann W., 1978]. Пролонгированное изоэлектрическое фокусирование на пластинах, содержащих амфолиты при pH 4—6,5, позволило авторам обнаружить среди лиц с тремя основными фенотипами (TfC1, TfC2-1 и TfC2) еще три новых, дополнительных фенотипа: обозначенных TfC3-1, TfC3-2 и TfC3.

Таким образом, изменив методику изоэлектрофокусического исследования, P. Kühnl и W. Spielmann доказали еще бо́льшую полиморфность генетически детерминированной системы сывороточного трансферрина и вполне логично высказали предположение о существовании в генном локусе этой системы не двух основных аллелей Tf^{c1} и Tf^{c2}, а трех основных аллелей: Tf^{c1}, Tf^{c2} и Tf^{c3}. На рис. 8 представлена диаграмма шести основных фенотипов трансферрина, выявленных методом пролонгированного изоэлектрического фокусирования при pH 4,0—6,5. Она убедительно демонстрирует, что полная «шестифенотипная» полиморфность трансферринов может быть обнару-

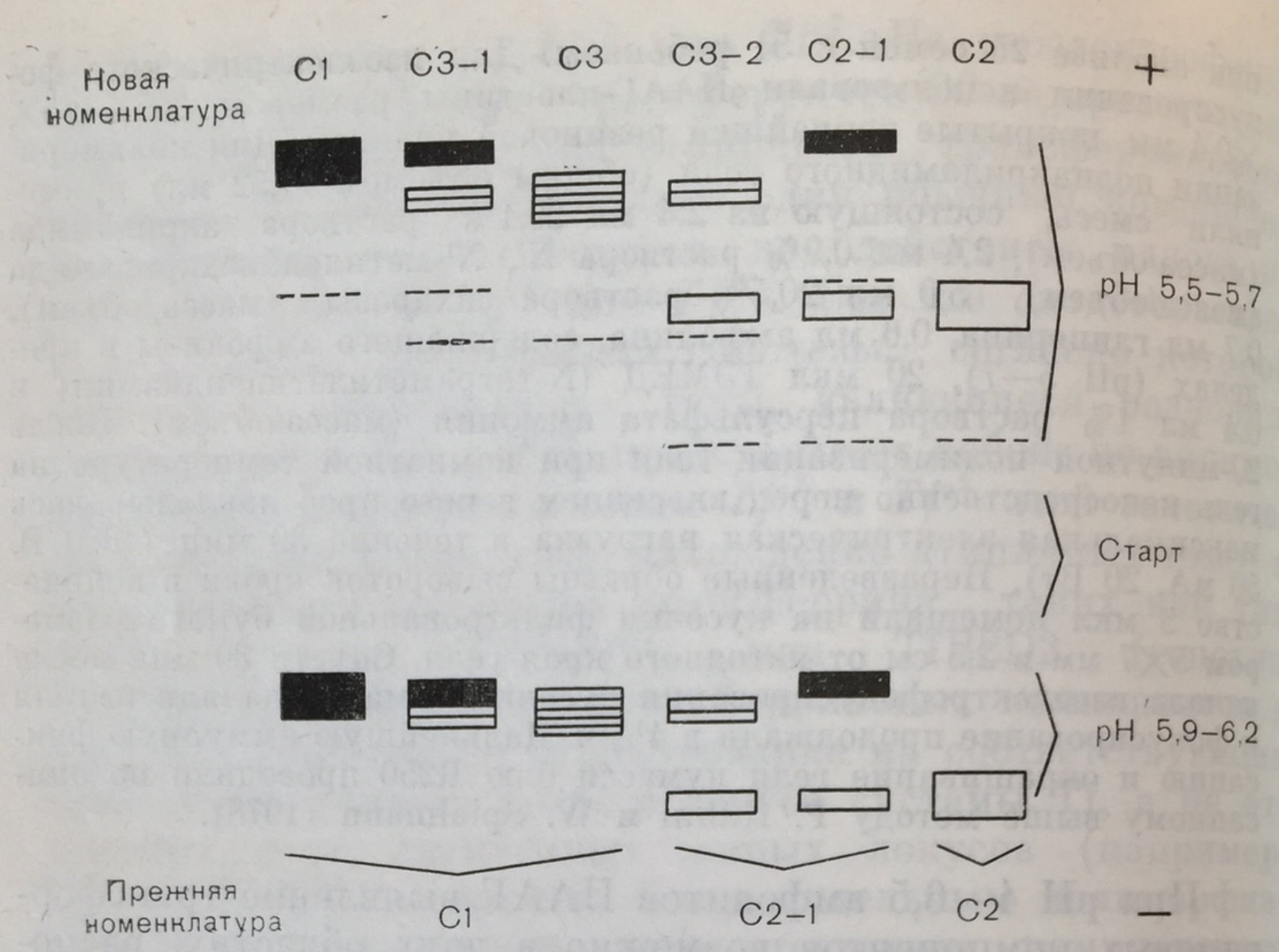


Рис. 8. Диаграмма подтипов TfC после изоэлектрофокусирования на ПААГ-пластинах (pH 4—6,5).

Полная полиморфность Tf (6 фенотипов: C1, C3-1, C3, C3-2, C2-1, C2) наблюдается в анодной области pH 5,5—5,7. В прежней катодной области типизации Tf (pH 5,9—6,2) возможно выявление лишь трех фенотипов Tf (C1, C2-1, C2).

жена только в анодной по отношению к старту части полиакриламидного геля, имеющей pH в пределах 5,5—5,7. В прежней катодной зоне полиакриламидного геля с pH 5,9—6,2 можно практически выявить лишь три фенотипа трансферрина — TfC1, TfC2-1 и TfC2. Пунктирными линиями на рис. 8 обозначены слабовыраженные трансферриновые компоненты, появление которых, так же как и основных компонентов в шести различных фенотипах Tf, обусловлено действием одного из трех основных аллелей Tf^{c1}, Tf^{c2} и Tf^{c3} в генном локусе этой системы. Диаграмма трансферриновых компонентов показывает также, что в ранее рекомендованной для типизации групп трансферрина катодной части геля с pH 5,9—6,2 практически неразличимы фенотипы TfC3-2 и TfC2-1, а также фенотипы TfC3-1 и TfC1. В анодной же части геля с pH 5,5—5,7 все шесть основных фенотипов трансферрина легко различимы. TfC3-1 четко разделяется на два основных компонента, причем более анодный компонент обладает выраженностью основного компонента в гомози-

готном фенотипе TfC1, а менее анодный совпадает с основным компонентом в гомозиготном фенотипе TfC3. Гетерозиготный фенотип TfC3-2 демонстрирует сложный набор трансферриновых компонентов, характерный для эквивалентной смеси образцов сывороток гомозиготных фенотипов TfC3 и TfC2.

Авторы смогли показать, что генотический продукт нового аллеля Tf^{c3} β_1-глобулин TfC3 по изоэлектрической точке, оптимуму pH или изоэлектрической подвижности очень мало (приблизительно на 0,015 единиц pH) отличается от TfC1, генетически реализующегося под действием аллеля Tf^{c1}. Кроме того, четкое выявление шести основных фенотипов трансферринов, каждый из которых отражает единственно возможную для него генотипическую комбинацию, возможно лишь на ПААГ-пластинах, насыщенных амфолитами в довольно узких пределах pH 4—6,5 или 5—7.

Частота встречаемости аллеля Tf^{c3} системы Tf, определенная при исследовании 252 не связанных родством жителей ФРГ, составила 4,2%. Анализ сывороток крови тех же 252 лиц позволил P. Kühnl и W. Spielmann (1979) выявить семь трансферриновых фенотипов: шесть обычных (TfC1, TfC2-1, TfC2, TfC3-1, TfC3-2, TfC3) и один «вариантный» (TfC1B2). На основе частоты их распределения определена генная частотность для аллелей системы трансферрина: для аллеля Tf^{c1} 79,5%, для аллеля Tf^{c2} 15,5%, для аллеля Tf^{c3} 4,2%, для аллеля Tf^{b2} 0,8%. Описанные выше семейные обследования отчетливо показали простой аутосомальный кодоминантный порядок наследования как всех трех основных трансферриновых аллелей, так и «атипичного» аллеля Tf^{b2}.

Использование «расширенного» генетически обусловленного полиморфизма сывороточной системы Tf в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства (с учетом наличия в генном локусе этой системы трех основных и множества редких «атипичных» аллелей) позволит повысить вероятность исключения ложно указанного в качестве отца мужчины только по одной этой системе с 0,64—1% [Chakraborty R. et al., 1974] при использовании различных электрофоретических методов (электрофорез в гелях крахмала, агарозы и полиакриламида) до 15,5% [Kühnl P., Spielmann W., 1979] при применении модифицированного метода изоэлектрического фокусирования на ПААГ-пластинах с последующей иммунной фиксацией.

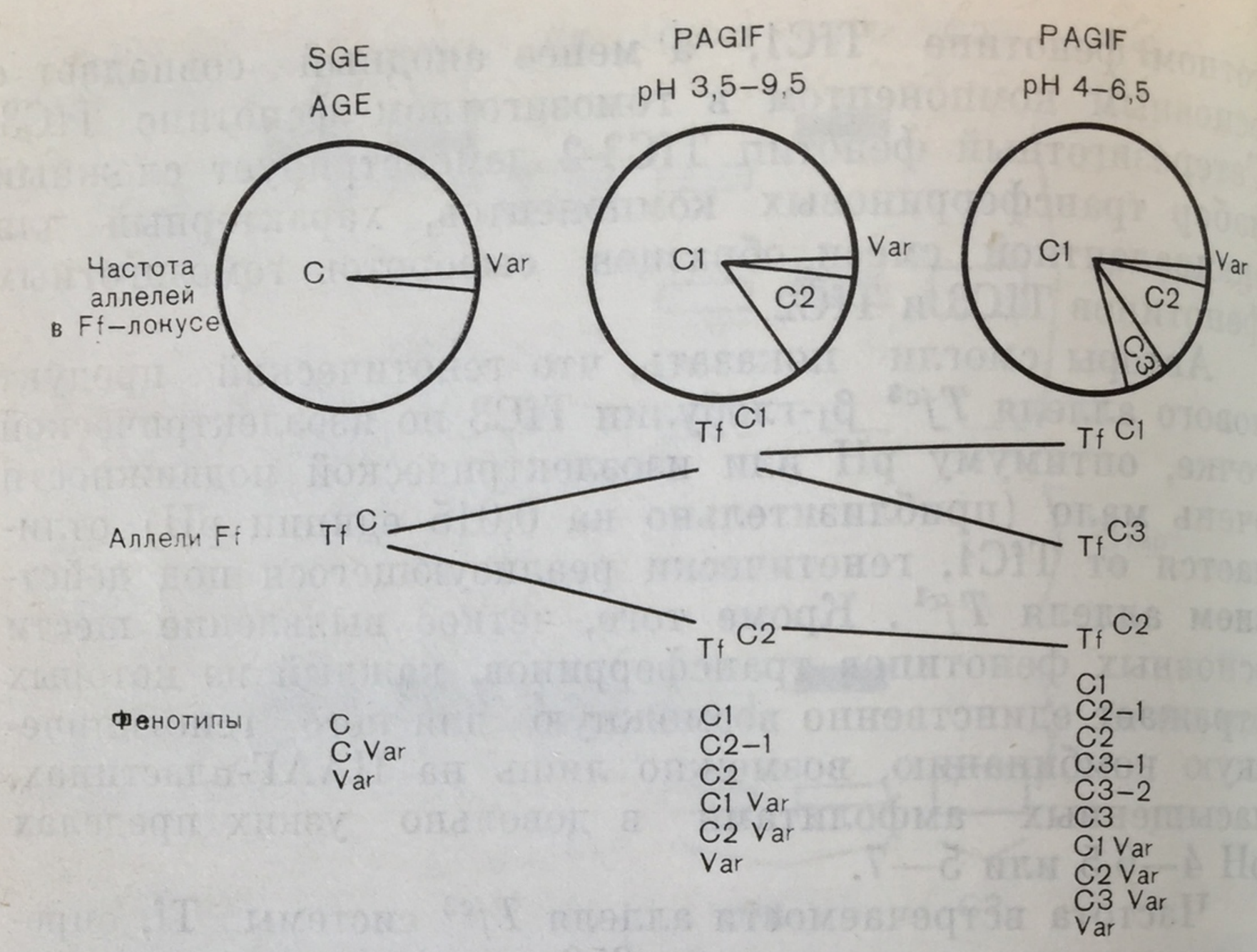


Рис. 9. Расширение возможностей типизации групп Tf при использовании различных методов разделительного анализа.

SGE, AGE — методы электрофореза в геле крахмала и агарозы, PAGIF — метод изоэлектрического фокусирования на ПААГ-пластинах. Var — варианты TfB и TfD. Сегменты в круге отражают количество групп Tf и частоту их встречаемости среди населения земного шара.

Рис. 9 показывает, насколько расширились наши знания о генетике системы сывороточного трансферрина. Следовательно, возросли и экспертные возможности при использовании генетически обусловленного полиморфизма этой системы в судебно-медицинских экспертизах в делах о спорном происхождении ребенка с учетом применения различных аналитических методов исследования.

Сочетание модифицированной методики P. Kühnl и W. Spielmann (1979), позволяющей обнаруживать «расширенный» полиморфизм системы трансферрина, с методикой B. Hoste (1979), позволяющей неиммунологическим путем обнаружить полиморфизм системы Gc после изоэлектрического фокусирования на ПААГ-пластинах, даст возможность судебно-медицинским экспертам одновременно (!) выявлять чрезвычайно широкий полиморфизм этих сывороточных систем в экспертизах спорного отцовства. Это повысит вероятность исключения мужчины, не являющегося фактическим отцом ребенка, сразу на 44,86% для обеих систем.

Глава 15

СИСТЕМА С3 (ПОСТТРАНСФЕРРИНОВ)

О полиморфизме третьего компонента комплемента сыворотки крови человека (компонент С3, или β_1с-глобулин) впервые сообщили C. Ropartz и соавт. (1965). В период с 1967 по 1969 г. различные группы исследователей независимо друг от друга с помощью электрофоретических методов доказали существование генетически детерминированного полиморфизма в области β_1с-глобулинов сыворотки крови человека, не связанного со всеми ранее известными сывороточными групповыми системами. Естественно, что каждая группа исследователей давала собственную номенклатуру или обозначение этой новой сывороточной системе.

Так, A. B. Wieme и H. Segers (1968), используя электрофорез в агаровом геле, выявили генетически обусловленный электрофоретический вариант С3-компонента (С3-полиморфизм), на фореграмме он разделился на две части. Ch. Alper и R. P. Propp (1968) с помощью высоковольтного электрофореза в геле агарозы подтвердили существование генетически детерминированного С3-полиморфизма. Авторы предположили, что этот полиморфизм обусловлен действием в соответствующем генном локусе сывороточной системы С3 пяти аллелей: F_1, $F_{0,8}$, F, S и S_1. Согласно этой гипотезе, сывороточная система С3 имеет 15 возможных генотипических комбинаций, реализующих появление 15 различных ее фенотипов.

E. A. Azen и O. Smithies (1968) также наблюдали генетически детерминированный полиморфизм β_1с-глобулиновой сывороточной системы. Эти исследователи предложили новую цифровую номенклатуру аллелей, обусловливающих полиморфизм системы С3. И, наконец, M. Rose и G. Geserick (1969) смогли доказать, что генетически обусловленный полиморфизм этой системы электрофоретически выявляется в области, непосредственно располагающейся после (к катоду) зоны генетически детерминированных компонентов сывороточного трансферрина. По предложению авторов эта полиморфная система была названа системой посттрансферринов (Pt). Аллели, определяющие ее полиморфизм, по аналогии с аллелями системы трансферринов обозначили как Pt^a, Pt^b и Pt^c. Таким образом, из пятиаллельной генетически обусловленной системы система С3 (или посттрансферринов) превратилась в

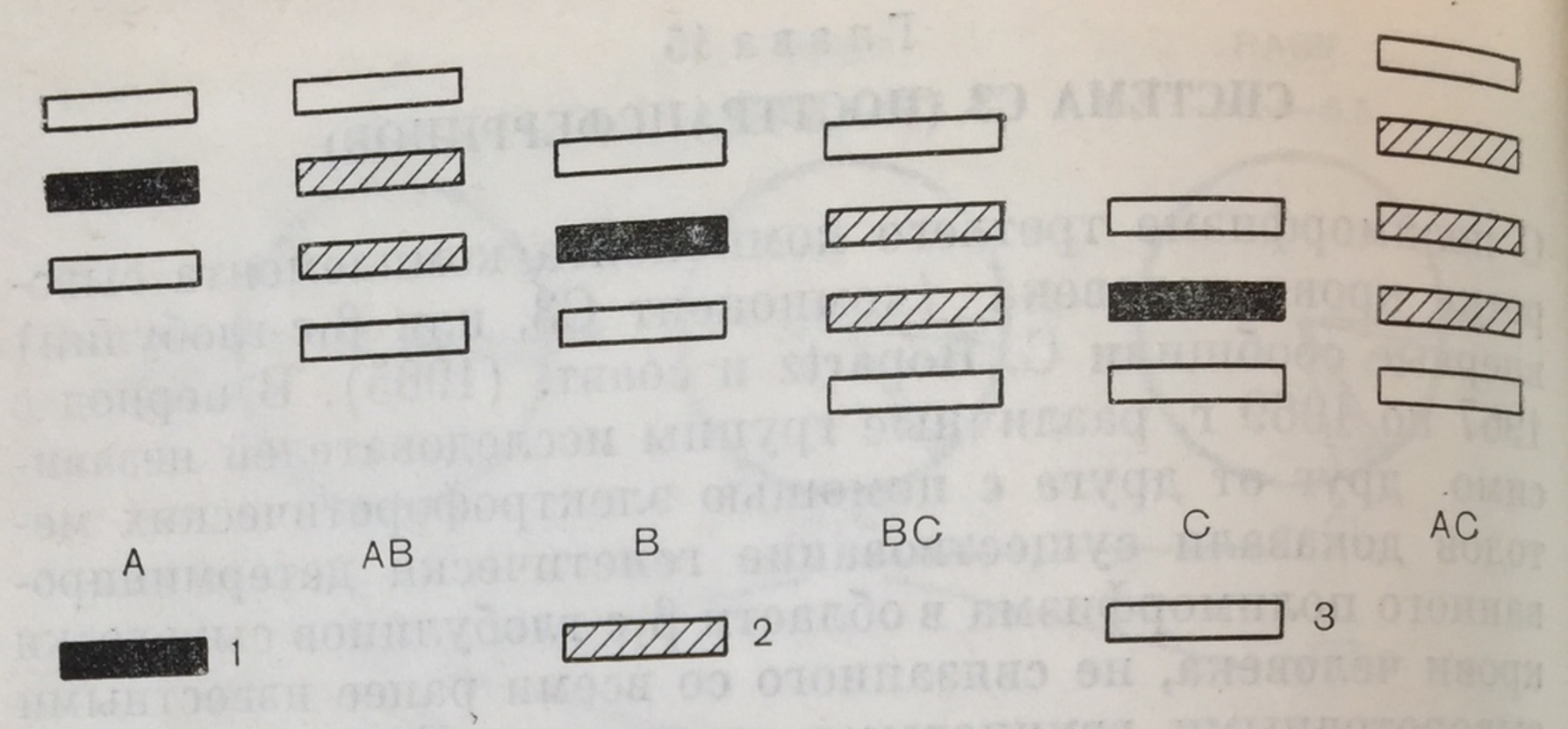


Рис. 10. Фореграммы (схема) Pt различных фенотипов [по Rose M., Geserick G., 1969].

1 — компоненты гомозиготных типов; 2 — компоненты гетерозиготных типов; 3 — слабо интенсивные компоненты. Объяснение см. в тексте.

трехаллельную кодоминантную генетически обусловленную систему с шестью возможными генотипическими комбинациями и, следовательно, с шестью фенотипами, или группами, пять из которых обнаружили M. Rose и G. Geserick.

Результаты семейных обследований, проведенных M. Rose и G. Geserick, и вычисленные на их основе частоты встречаемости аллелей, обусловливающих полиморфизм системы C3, дали возможность авторам вполне аргументированно выдвинуть гипотезу о существовании в генном локусе данной системы трех (а не пяти) основных аллелей (Pt^a, Pt^b и Pt^c). Эта гипотеза не исключает существования довольно редких (атипичных) аллелей, генетические продукты которых, необычные C3-компоненты, по-видимому, и наблюдали Ch. Alper и R. P. Propp (1968), выдвинувшие пятиаллельную генетическую гипотезу наследования C3-компонента.

На рис. 10 показаны фореграммы посттрансферринов шести основных фенотипов A, AB, B, BC, C и AC. Черным цветом обозначены компоненты посттрансферринов (максимальная интенсивность) трех гомозиготных фенотипов Pt A, B и C; компоненты в трех гетерозиготных фенотипах AB, BC и AC заштрихованы, остальные обозначения — малоинтенсивные «микрофракции», характерные для всех шести основных фенотипов Pt.

Почти абсолютная идентичность C3- и Pt-полиморфизма, доказанная M. Rose и G. Geserick (1969), помогла понять и основную ошибку Ch. Alper и R. P. Propp (1968),

которые при высоковольтном электрофорезе в геле агарозы наблюдали, по-видимому, не только генетически детерминированный полиморфизм посттрансферринов, относящихся к β_{1a}-глобулинам, а «расширенный» полиморфизм C3, захватывающий и область β_1c-глобулинов. Кроме того, M. Rose и G. Geserick экспериментировали со свежими образцами сывороток крови, Ch. Alper и R. P. Propp (1968) исследовали старые консервированные образцы, и не исключено, что наблюдаемый ими «расширенный» полиморфизм C3 был обусловлен либо добавлением к сывороткам консерванта, либо частичным распадом сывороточных β-глобулинов. Влияние старения сывороток крови на изменение фореграмм групповых посттрансферринов (кстати, индивидуальных для конкретного образца) отмечали также другие авторы, наблюдавшие изменение скорости миграции C3-, или Pt-компонентов при длительном хранении образцов сывороток.

Результаты семейных обследований свидетельствовали о простом кодоминантном аутосомальном порядке наследования групп C3, или Pt, о наличии трех основных и многих редких атипичных аллелей в генном локусе этой системы или тесно сцепленных сывороточных систем.

Сообщения о многочисленных новых вариантах системы C3 или Pt, отличающихся друг от друга лишь незначительным изменением скорости миграции C3- или Pt-компонентов, привели к тому, что в 1972 г. состоялся международный симпозиум под эгидой ВОЗ, посвященный полиморфизму C3-компонента комплемента. Были рекомендованы строго определенные методы электрофоретического выявления полиморфизма C3 или сывороточных посттрансферринов. По принятой на симпозиуме новой международной номенклатуре, два основных гомозиготных варианта C3, ранее обозначавшихся C3A и C3B (или PtA и PtB), в соответствии со скоростью миграции их β-глобулиновых компонентов стали называться вариантами C3F и C3S (или PtF и PtS), а все редкие атипичные варианты — либо быстрыми, например, C3F0,5, C3F1,2 (PtF0,5; PtF 1,2), либо медленными вариантами, например, C3S0,25, C3S0,6 (PtS 0,25, PtS 0,6).

Обычный гетерозиготный вариант по новой номенклатуре называют вариантом C3FS, или PtFS, а гетерозиготные атипичные варианты, генотипически характеризующиеся сочетанием одного из обычных аллелей в генном локусе этой системы $C3^F$ или $C3^S$ (Pt^F или Pt^S) и одного

атипичного аллеля этой системы, также в зависимости от электрофоретической подвижности β-глобулиновых компонентов, — вариантами F0,5S, FS 0,4 и т. д. Все аллели в генном локусе *C3*, или *Pt*, обозначают $C3^{F}$, $C3^{S}$ (основные аллели) и $C3^{F0,5}$, $C3^{S1,3}$ (редкие атипичные аллели).

Обнаружено более 20 редких атипичных вариантов C3, или Pt, частота встречаемости которых в европеоидных популяциях не превышает 1% [Mauff G. et al., 1974].

На обширном материале показана идентичность комплементарной сывороточной системы C3 и системы сывороточных посттрансферринов [Mauff G. et al., 1974].

Исследовали 541 образец сывороток крови различных доноров с помощью двух электрофоретических методов, позволяющих улавливать генетически детерминированный белковый полиморфизм в области как β_1c-, так и β_1a-глобулинов. При электрофорезе 537 образцов получены полностью сопоставимые результаты. что позволило отнести эти образцы к одним и тем же фенотипам, или группам, сывороточных систем. При этом, как и ожидалось, фенотип C3F соответствовал фенотипу PtA, фенотип C3S — фенотипу PtB, фенотип C3FS — фенотипу PtFS. В 4 образцах, исследованных на полиморфизм C3, выявлены редкие атипичные варианты, которые были идентифицированны как C3F0,65S, C3F0,6S, C3F0,55S и C3F0,5. В отношении полиморфизма посттрансферринов результаты оказались несколько иными. Так, атипичный, довольно редкий, образец C3F0,5S, генотипически гетерозиготный по обычному аллелю *C3* и атипичному аллелю $C3^{F0,5}$, при использовании электрофореза диагностировался как обычный гомозиготный фенотип PtB. Три других атипичных образца сывороток C3 соответствовали при применении Pt-электрофоретической техники гетерозиготному фенотипу PtAB, причем при многократных исследованиях этих образцов в различных условиях электрофореза не было выявлено никаких отклонений в скорости миграции Pt-компонента A.

M. Rose и G. Geserick (1969) при исследовании 407 образцов сывороток крови Болгарии обнаружили 21 различный атипичный фенотип посттрансферринов. Однако до сих пор неясно, идентичны ли все эти атипичные образцы Pt, мигрирующие в области β_1a-сывороточных глобулинов, атипичным образцам C3 с подвижностью β_1c-глобулинов. На этом фоне совершенно неожиданными выглядят результаты исследования 522 образцов сывороток крови населения Берлина, в котором обнаружили лишь 5 посттрансферриновых фенотипов: A, AB, B, BC и AC.

В настоящее время можно заключить, что C3- и Pt-полиморфизм, конечно же, имеет единую генетическую природу, о чем свидетельствует почти полное совпадение частот распространения основных аллелей $C3^{F}$ и $C3^{S}$ сис-

темы С3 и основных аллелей Pt^a и Pt^b системы Pt среди европейского населения, которые составляют в среднем соответственно 20 и 80%. Поэтому в большинстве современных публикаций, посвященных этим полиморфным (и тождественным!) системам, во избежание путаницы вводится единое обозначение — система третьего компонента сывороточного комплемента, или сывороточная система С3.

Полиморфизм системы С3 обусловлен существованием в генном локусе этой системы двух основных аллелей $C3^F$ и $C3^S$ и, по-видимому, множества редких атипичных аллелей, ответственных за появление трех основных (C3FF, C3FS и C3SS) и множества редких атипичных фенотипов. Последние генотипически чаще являются гетерозиготными по какому-либо атипичному аллелю и одному из основных аллелей. Однако уже найдены гетерозиготные и даже гомозиготные фенотипы С3 только по атипичным аллелям этой системы, например C3F0,5S1,5; C3S1,5S0,5 и др.

Генетически детерминированный полиморфизм системы С3 уже применяется в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства. Высокая частота встречаемости основных аллелей системы С3 (особенно среди европеоидных популяций) делает ее весьма информативной в подобных экспертизах. Например, по данным R. Chakraborty и соавт. (1974), средняя вероятность исключения отцовства мужчин, ложно указанных в качестве отцов, только по системе С3 составляет для европеоидных, негроидных и монголоидных популяций соответственно 15,23; 8,13 и 1,92%. По данным O. Prokop и W. Göhler (1976), вероятность исключения отцовства по системе Pt среди населения европейских стран значительно выше и составляет 20,7%.

Некоторые исследователи считают, что использовать систему С3 в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства следует весьма осторожно, поскольку не так уж редко (приблизительно в 1% случаев) эксперт может встретить атипичные фенотипы С3, которые электрофоретически сходны с основными группами C3FF, C3FS и C3SS. Из рис. 11 видно, что некоторые атипичные гетерозиготные варианты С3 трудно отличить от обычного гетерозиготного варианта C3FS. Поэтому во избежание экспертных ошибок некоторые авторы [Sahai S. et al., 1978, и др.] рекомендуют обязательное параллельное электрофоретическое разделение в 1% геле агарозы как исследуемых образцов сывороток крови ответчика, ребенка

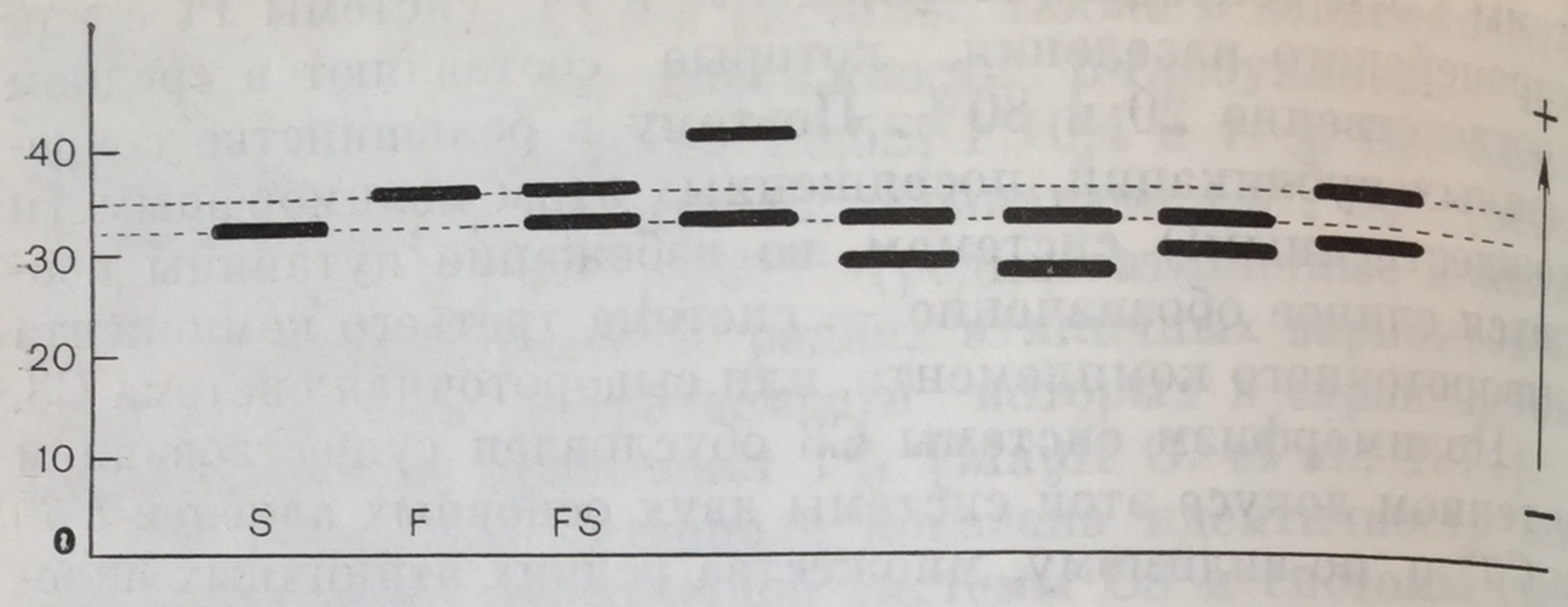


Рис. 11. Диаграмма электрофоретических образцов трех обычных фенотипов С3 (S, F и FS) и пяти ее атипичных фенотипов, являющихся генотипически гетерозиотными по одному из основных аллелей ($C3^S$ или $C3^F$) и одному из атипичных аллелей этой системы. 0—40 шкала в миллиметрах от старта до соответствующих компонентов С3.

и его матери, так и заведомо известных контрольных образцов сывороток с тремя основными фенотипами C3FF, C3SS и C3FS (применение при электрофорезе обычного образца C3FS обязательно). Для облегчения выявления и распознавания типов С3 рекомендуют также после электрофореза использовать иммунную фиксацию с иммунной антисывороткой, специфически осаждающей белки сыворотки крови в области β_1с-глобулинов, т. е. моновалентную преципитирующую иммунную сыворотку анти-С3.

Для этого после 30-минутного высоковольтного электрофореза в 1% геле агарозы на гель в области миграции β-глобулинов на 5—10 мин накладывают полоску ацетатной целлюлозы, смоченную антисывороткой. Затем полоску удаляют, гель многократно промывают в дистиллированной воде. Для более четкого выявления разделенных компонентов гель окрашивают 2% водным раствором амидошварца 10В или кумасси блю R250 в смеси метанола и дистиллированной воды (2:2:1) в течение часа при 37 °С. Для последующего отбеливания в раствор для красителя вместо красителя добавляют 50% уксусную кислоту.

Предложенный метод более надежен, чем все другие электрофоретические методы, однако необходимость в моновалентной иммунной сыворотке анти-С3 ограничивает широкое применение метода в судебно-медицинской практике.

Следует отметить, что наличие в сывороточной системе С3 большого числа генетически детерминированных атипичных вариантов иногда позволяет по редким фенотипам С3 сделать аргументированное заключение о том, яв-

ляется ли ответчик отцом данного ребенка. Естественно, что такой вывод можно сделать только после расширенного исследования генетических маркеров различных групповых систем крови у всех проходящих по делу лиц, не исключающего возможности рождения данного ребенка от конкретной родительской пары. Однако для четкого выявления атипичных вариантов С3 необходимо использовать, по-видимому, все же метод иммунной фиксации С3-белков после их электрофоретического разделения.

Глава 16
СИСТЕМА С4

Система четвертого компонента сывороточного комплемента, или система С4, групповые полиморфные протеины которой являются β_2-глобулинами, — одна из самых сложных и полиморфных сывороточных систем крови человека, открытых за последнее время. Впервые электрофоретическую гетерогенность протеинов в области β_2-сывороточных глобулинов описали S. Rosenfeld и соавт. (1969). Позднее, с развитием и совершенствованием техники электрофоретического анализа сложный полиморфизм протеинов области С4 был систематизирован в групповом отношении. Это позволило выдвинуть гипотезу о генетической обусловленности полиморфных белков С4 [Teisberg P. et al., 1976; Mauff G. et al., 1978] и даже создать формально-генетическую модель наследования групп системы С4, правильность которой подтверждена последующими семейными обследованиями.

В настоящее время считается доказанным, что сложный генетически детерминированный полиморфизм сывороточной системы С4 обусловлен действием множественных аллелей в едином (или в двух или нескольких тесно сцепленных генных локусах этой системы), который (или которые) очень близко расположен к генному локусу системы тканевых антигенов (HLA-B) на аутосомальной хромосоме № 6 [Teisberg P. et al., 1976]. Причем результаты семейных обследований, исследований пар мать — ребенок и близнецов свидетельствуют о простом кодоминантном аутосомальном порядке наследования групп системы С4; этот порядок и гаплотипичный, подобный наследственной передаче групповых антигенов и фенотипов систем MNSs, Rh, HLA, Gm и Ag. B. Olaisen и соавт.

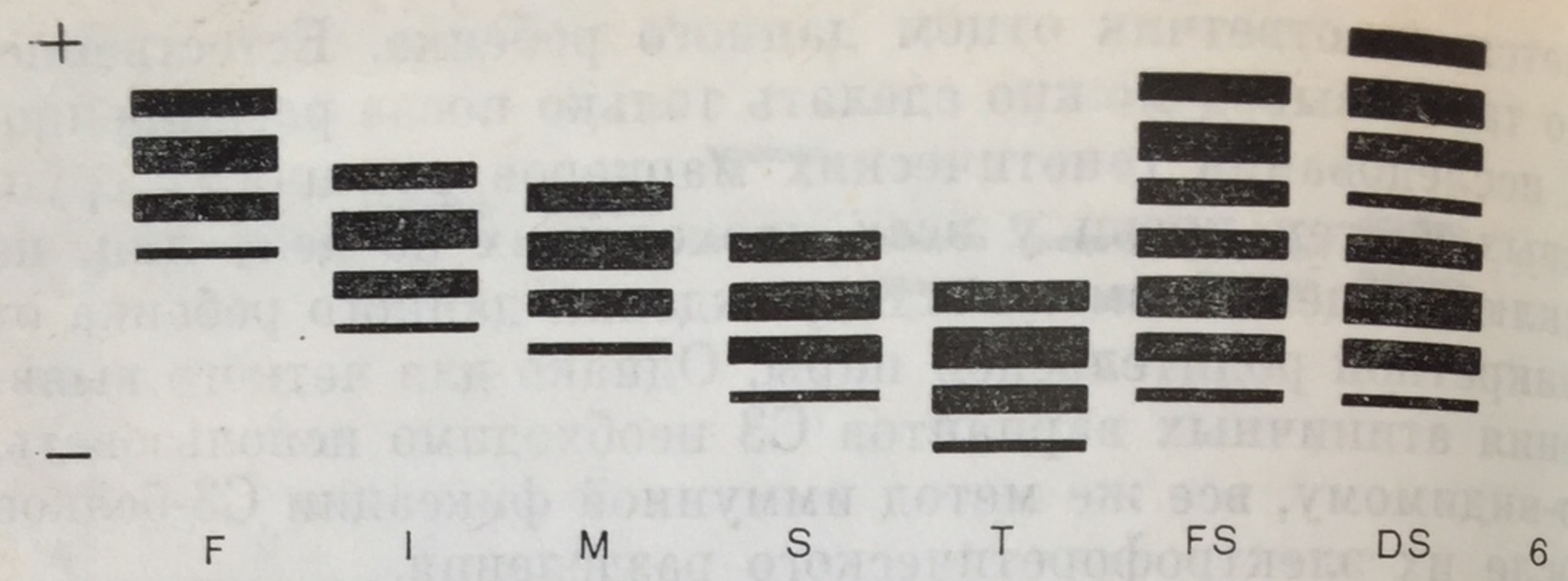


Рис. 12. Диаграмма семи различных С4-гаплотипических продуктов (F, I, M, S, T, FS, DS) после высоковольтного электрофореза в геле агарозы с последующей фиксацией протеинов С4 преципитирующей сывороткой анти-С4.

(1979) показали, что в генном локусе (или локусах) системы С4 имеются по крайней мере семь гаплотипов, которые теоретически могут составить при хромосомных делениях 28 (!) различных гаплотипических или генотипических комбинаций. Подавляющее большинство таких комбинаций легко устанавливаются с помощью электрофоретических или изоэлектрофокусических методов, выявляющих тот или иной фореграммный спектр или фенотип белков С4 (рис. 12).

B. Olaisen и соавт. (1979) собрали данные обследования 89 норвежских семей с 327 детьми, а также результаты анализа большой серии сывороток крови не связанных родством жителей Норвегии. Фенотипы сывороточной системы С4 определяли по методу P. Teisberg и соавт. (1976) с небольшими модификациями. Цельные обработанные гепарином образцы сывороток крови в количестве около 8 мкл подвергали высоковольтному (40 В/см) электрофоретическому разделению в 1% геле агарозы в течение 2 ч с использованием циркулирующей охлаждающей системы. Для электрофореза применяли непрерывную буферную систему: переходный буфер— 0,05 М трис, 0,0034 М лимонная кислота, 0,017 М борная кислота, 0,0078 М NaOH (pH 8,65). В качестве гелевого буфера использовали переходный буфер, разведенный дистиллированной водой 1:1. Для приготовления агарозного геля применяли химически чистый препарат агарозы типа HSB фирмы Glostrup (Дания). Для иммунной фиксации белков С4 использовали моновалентные иммунные преципитирующие сыворотки анти-С4 американского и английского производства.

На основании полученных данных (табл. 18) была доказана правильность формально-генетической модели наследования фенотипов С4. Согласно модели, в генном локусе (или тесно сцепленных генных локусах системы С4) действуют семь различных аллелей или гаплотипов

Таблица 18

Генотипы С4 в 89 норвежских семьях с 327 детьми

Родительские пары	Дети
F/F×F/F (1)	*F/F* (6)
F/F×FS/F	*F/F*, *FS/F*
F/F×FS/M	*F/M*, *FS/M*
F/F×FS/S	*F/S*
F/F×FS/FS (3)	*F/FS* (10)
S/S×FS/F	*F/S*, *FS/S*
S/S×FS/M	*M/S*, *FS/S*
S/S×FS/FS (1)	*S/FS* (5)
FM/S×F/S	*M/S*
F/M×FS/F	*F/F*, *F/M*, *FS/M*
F/M×FS/M	*F/M*, *M/M*, *FS/M*
F/M×FS/S	*F/S*
F/S×FS/F	*F/F*, *F/S*, *FS/F*, *FS/S*
F/S×FS/1	*FS/F*, *FS/S*, *F/1*, *1/S*
F/S×FS/M	*F/S*, *FS/F*, *FS/S*
F/S×FS/S	*F/S*, *S/S*, *FS/S*
FS/F×FS/F	*F/F*, *F/FS*
FS/F×FS/M	*F/M*, *FS/F*, *FS/M*, *FS/FS*
FS/F×FS/S	*F/S* или *FS/FS** *FS/F*, *FS/S*
FS/F×DS/F	*FS/F*, *FS/FS*, *DS/F*, *DS/FS*
FS/F×DS/FS	*FS/F*, *FS/FS*, *DS/F*, *DS/FS*
FS/S×M/S	*S/S*
FS/S×DS/S	*S/S*, *FS/S*, *DS/S*, *DS/FS*
FS/S×DS/FS	*FS/FS*, *DS/S*
FS/FS×FM	*FS/F*, *FS/M*
FS/FS×F/S	*FS/F*, *FS/S*
FS/FS×MS	*FS/M*
FS/FS×S/t	*FS/S*, *FS/t*
FS/FS×FS/F	*FS/F*, *FS/FS*
FS/FS×FS/M	*FS/M*, *FS/FS*
FS/FS×FS/S	*FS/S*, *FS/FS*
FS/FS×FS/FS (6)	*FS/FS* (26)
FS/FS×DS/F	*FS/F*, *DS/FS*
FS/FS×DS/M	*FS/M*, *DS/FS*
FS/FS×DS/S	*FS/S*
FS/FS×DS/FS	*FS/FS*, *DS/FS*

Примечание. В рамках — «критические пары» по системе С4; цифры в скобках — число таких пар и число родившихся детей.
* В браках *FS/F×FS/S* дифференцирование генотипов *F/S* и *FS/FS* у детей не представляется возможным.

(генных комплексов или аллельных сочетаний), которые и обусловливают исключительно широкий и сложный генетически детерминированный полиморфизм этой сывороточной системы. Ценность семейных обследований, проведенных B. Olaisen и соавт. (1979), заключается в следующем.

1. Исследуя не такое уже большое число семей (89), авторы смогли выявить всего лишь среди 505 обследован-

ных (178 родителей и 327 детей) 19 различных фенотипов системы C4 из 28 теоретически возможных, которые могут реализоваться при наличии 28 генотипических комбинаций, возникающих при наследственной передаче одного из семи гаплотипов системы C4 от отца и матери своему ребенку. Это 15 фенотипов (FSFS, FSF, FS, FF, FSM, FSS, SS, FM, FSI, FSDS, FDS, MS, SDS, St, MDS), которые были обнаружены хотя бы у одного из родителей, и 4 фенотипа (MM, FI, SI и FSt), найденные только у детей, 9 других возможных фенотипов обнаружены не были (гомозиготные C4tt, II и DSDS, гетерозиготные DSI, DSt, It, MT, Ft и MI). Очевидно, невыявление девяти фенотипов в данной семейной выборке связано с довольно редкой частотой встречаемости трех (DS, I и t) из семи гаплотипов в генном локусе (локусах) системы C4.

2. По-видимому, по фореграммам белков C4 можно четко определить 26 или 28 возможных фенотипов системы C4, каждый из которых отражает единственно возможную для этого фенотипа генотипическую или гаплотипическую комбинацию. Этот факт имеет огромное значение для использования системы C4 в популяционно-генетических, антропологических и судебно-медицинских исследованиях, особенно в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства.

Два фенотипа — C4FS и C4FSFS — электрофоретически не различаются. Так, выявлены 4 родительские пары с фенотипами C4FSF×C4FSS, в этих семьях было 13 детей. У 4 детей четко определены фенотипы C4FSF (у 2 детей) и C4FSS (у 2 детей). У 9 детей фореграммный спектр белков C4 мог соответствовать как фенотипу C4FSFS, так и фенотипу C4FS. Из этого следует, что у лиц с фенотипом C4FS (C4FSFS) остается неизвестной их истинная гаплотипическая комбинация (*F/S* или *FS/FS*), хотя и в том и в другом случае возможность рождения детей от указанных родительских пар не исключалась.

3. Семейные обследования подтвердили правильность формально-генетической гипотезы о контролировании полиморфизма сывороточной системы C4 семью различными гаплотипами, частота встречаемости которых в соответствующем генном локусе (локусах) системы C4 далеко не одинакова. Обследования семей, а также не связанных родством лиц позволили вычислить частоту встречаемости семи гаплотипов системы C4, контролирующих ее полиморфизм, для населения Норвегии;

54% C4FS, 22% C4F, 14% C4S, 8% C4M. 1% C4DS, 0,5% C4I, 0,5% C4t.

4. Доказан простой кодоминантный аутосомальный порядок наследования всех гаплотипов системы С4, обусловливающий появление 28 возможных гаплотипических сочетаний, следовательно, и фенотипов системы С4.

В пользу этого свидетельствует тот факт, что ни в одной из обследованных 89 семей не было отмечено рождения хотя бы одного ребенка, фенотип которого противоречил бы общепринятому правилу наследования фенотипов, или групп, этой системы. Более того, авторы наблюдали 11 так называемых «критических» пар, в которых оба родителя имели гомозиготную одинаковую или различную гаплотипическую комбинацию по аллелям генного локуса (локусов) системы С4 и должны были передать по наследству своим детям (если, естественно, генетическая гипотеза порядка наследования групп системы С4 соответствует истине) также единственно возможную гомо- (в первом случае) или гетерозиготную (во втором случае) гаплотипическую комбинацию аллелей системы С4, обусловливающую появление единственно возможных для них гомо- или гетерозиготных фенотипов С4. Родившиеся в этих семьях 47 детей действительно имели единственно возможный фенотип С4 с учетом фенотипов этой системы у их родителей. Так, в одной «критической» семье C4FF×C4FF могли родиться дети только с таким же гомозиготным фенотипом и, действительно, все 6 детей в этой семье имели фенотип C4FF. В другой семье C4SS× ×C4FSFS могли родиться дети с единственно возможным гетерозиготным фенотипом C4SFS — все 5 детей этой семьи его и имели. В трех «критических» семьях C4FF×C4FSFS родилось 10 детей с единственно возможным для них гетерозиготным фенотипом C4FFS, и, наконец, в шести семьях, где оба родителя имели одинаковый гомозиготный фенотип C4FSFS, родилось 26 детей также с единственно возможным для них гомозиготным фенотипом C4FSFS.

5. Исследование наследственной передачи сывороточных групп системы С4 позволило авторам как бы увидеть генетические продукты — С4-протеиновые фракции четырех наиболее распространенных гаплотипов системы С4 (FS, F, S, и M), поскольку неоднократно встречались гомозиготные генотипы или, вернее, гаплотипические гомозиготы *FS/FS* (фенотип C4FSFS), *F/F* (фенотип C4/FF), *S/S* (фенотип C4SS). Все это доказывает правильность генетической гипотезы о гаплотипичном порядке наследования групп системы С4.

Из-за отсутствия в семейных обследованиях, проведенных B. Olaisen и соавт. (1979), гаплотических гомозигот *DS/DS* (фенотип C4DSDS), *i/i* (фенотип C4ii) и *t/t* (фенотип C4tt) не удалось получить «в чистом виде» электрофореграммные спектры белков С4, представляющих собой генетические продукты гаплотипов DS, I и t. Это и не удивительно, поскольку суммарная частота встречае-

мости трех этих гаплотипов в генном локусе системы С4 для европеоидных популяций не превышает 1,5—2%, в то время как основной процент генов этого локуса (98—98,5) приходится на четыре других гаплотипа (FS, F, S и M). Однако P. Teisberg и соавт. (1976), G. Mauff и соавт. (1978) обнаружили еще две крайне редкие гаплотипические гомозиготы этой системы *DS/DS* (фенотип C4DSDS) и *I/I* (фенотип C4II), характеризующиеся соответствующими фореграммными спектрами белков С4, которые являются непосредственными генетическими продуктами гаплотипов DS и I (см. рис. 12).

Все изложенное выше позволяет признать перспективность использования генетически обусловленной сывороточной системы С4 в судебно-медицинских экспертизах в делах о спорном происхождении ребенка. При применении в таких экспертизах только одной системы С4 вероятность исключения мужчины, не являющегося фактическим отцом ребенка, будет очень высокой — около 30—35%.

Значительное преимущество электрофоретических или изоэлектрофокусических разделительных методов, при помощи которых выявляют генетически детерминированный полиморфизм многих сывороточных и ферментных систем крови человека, перед серологическими и иммунологическими методами заключается в том, что большинство фореграмм соответствующих белков, а также изоферментные спектры тех или иных ферментов определяют фенотип, которому соответствует единственно возможная генотипическая комбинация. Это в полной мере относится и к системе С4, 26 из 27 фенотипам которой соответствует единственно возможный для этого фенотипа гаплотип.

Поэтому при использовании этой системы в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства эксперту почти во всех случаях не требуется расширенного исследования фенотипов системы С4 у ближайших родственников проходящих по делу лиц, как это необходимо, например, при анализе систем Rh, MNSs, Gm и др. И лишь при одном фенотипе системы С4—C4FS(FSFS) — эксперт не знает точного гаплотипического сочетания (F/S или FS/FS), соответствующего этому фенотипу. В данном случае для решения вопроса о происхождении ребенка необходимо провести исследование фенотипов С4 у ближайших родственников проходящих по делу лиц с целью выявления истинных гаплотипов С4 у ребенка и его предполагаемого отца.

Например, ребенок, его мать и предполагаемый отец имеют один и тот же фенотип C4FS(FSFS). Такая возможность не так уж редка, если учесть частоту встречаемости трех гаплотипов, которые могут участвовать в двух возможных гаплотипическских комбинациях этого фенотипа: 54% FS, 22% F, 14% S. Вполне понятно, что если у ребенка и ответчика одни и те же гаплотипические комбинации из двух возможных (*F/S* или *FS/FS*), то отцовство ответчика в отношении данного ребенка по этой системе, естественно, не исключается. При различных же гаплотипах *FS/FS* у ребенка и *F/S* у ответчика и наоборот ответчик не может быть отцом ребенка. Исследования фенотипов C4 у родителей ответчика и матери ребенка показали следующее. Мать матери ребенка имела фенотип C4FSDS, а отец — C4FSM. Этим определялся истинный гаплотип системы C4 у их дочери — матери ребенка и самого ребенка, генотип которого мог быть только *FS/FS*. Естественно, что гаплотипично гомозиготная мать *FS/FS* передала по наследству своему ребенку гаплотип FS, такой же гаплотип ребенок унаследовал от отца. Мать ответчика (отца уже не было в живых) имела фенотип C4SS с единственно возможным генотипом *S/S*, что определяло и единственно возможный генотип ответчика—*F/S*. Таким образом эксперт смог вполне аргументированно исключить ответчика в качестве отца данного ребенка, поскольку в его гаплотипическом наборе отсутствовал гаплотип FS.

Приведенный пример доказывает необходимость исследования фенотипов, генотипов и гаплотипов многих систем крови у ближайших родственников, проходящих по делу о спорном отцовстве, когда у эксперта есть достаточные основания полагать, что такой анализ не исключает возможности выявления до этого неизвестного ему генотипа или гаплотипа ребенка и его предполагаемого отца. Мы понимаем, что внедрение в судебно-медицинскую экспертную практику полиморфной сывороточной системы C4 сопряжено с известными трудностями (применение высокочувствительных электрофоретических методов, дефицит иммунной преципитирующей моновалентной сыворотки анти-C4). Однако эта система вполне заслуживает того, чтобы хотя бы в крупных лабораториях или центрах нашей страны, углубленно изучающих современные проблемы судебно-медицинской экспертизы спорного отцовства, она была взята на практическое вооружение.

Раздел III
ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ

В последние годы была доказана молекулярная гетерогенность некоторых белков и большинства ферментов организма человека. Это стало возможным благодаря совершенствованию различных методов электрофоретического анализа в сочетании с выявлением специфической активности того или иного фермента. Структуру электрофоретически разделенного фермента в настоящее время можно представить его ферментограммой, изоферментным спектром. Изоферменты — это множественные молекулярные формы фермента, которые, обладая одинаковой, строго определенной биохимической направленностью, различаются по физико-химическим свойствам (электрофоретической подвижности, молекулярной массе, электрическому заряду и др.).

Большим достижением современной энзимологии и биохимической генетики явилось открытие генетической обусловленности ферментного полиморфизма, проявляющегося во многих ферментных системах крови, выделениях, клетках и тканях живого организма. Благодаря этому возникло новое понятие о ферментных системах крови (эритроцитарных, сывороточных и лейкоцитарных), тканей и выделений человека, которые привлекают внимание специалистов различных областей биологии и медицины и, естественно, судебных медиков. Открыто большое число генетически детерминированных ферментных систем крови человека, некоторые из которых находят свое практическое применение в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства. Остановимся лишь на тех системах, которые по частоте встречаемости аллелей, обусловливающих полиморфизм, наиболее информативны для экспертизы спорного происхождения детей.

Глава 17

СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ

Система кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) эритроцитов (КФЭ) была открыта D. Hopkinson и соавт. (1963) с помощью электрофореза в крахмальном геле.

Гемолизаты эритроцитов крови от различных лиц готовили из отмытых эритроцитов путем многократного замораживания и оттаивания. Строма разрушенных эритроцитов осаждалась центрифугированием, исследовали прозрачный лаковый супернатант. Для электрофореза использовали прерывистую трис-янтарно-цитратную буферную систему с pH 6,0. Гелевый буфер: 0,0026 М янтарной кислоты и 0,0046 М трис-буфера в 1 л дистиллированной воды; электродный буфер: 0,41 М лимонной кислоты и 1,18 М NaOH в 1 л дистиллированной воды. Электрофорез проводили при 4 °С в течение 16—17 ч, напряжение 6—7 В/см.

Для выявления зон ферментативной активности использовали инкубационную смесь: 143 мг дифосфата фенолфталеина (трехнатриевая соль) растворяли в 50 мл 0,05 М цитратного буфера (10,51 г лимонной кислоты, 6,38 г/л NaOH) и доводили раствор до pH 6,0 041 М лимонной кислоты. После электрофореза крахмальный гель продольно разрезали на две части и нижнюю половину блока инкубировали 2—3 ч при 37 °С в растворе субстрата. Затем с помощью раствора аммиака изменяли pH среды. Благодаря этому зоны фосфатазной активности на геле становятся красными. Поскольку фенолфталеин легко диффундирует в геле, то учет изоферментных спектров фермента производят в первые 30 мин после их проявления.

Оказалось, что кислая фосфатаза является гетерогенным ферментом. Авторы предположили, что изоферментный спектр фосфатазы генетически обусловлен. Семейные обследования, проведенные D. Hopkinson и соавт., подтвердили правильность этого предположения и позволили авторам создать формально-генетическую модель наследования групп КФЭ, согласно которой в соответствующем генном локусе этой системы действуют три кодоминантных аутосомальных аллеля, обозначенных P^a, P^b и P^c. Исходя из этого, система КФЭ имеет шесть фенотипов: три гомозиготны по соответствующим аллелям PA (генотип P^a/P^a), PB (генотип P^b/P^b) и PC (генотип P^c/P^c), три гетерозиготны — PAB (генотип P^a/P^b), PAC (генотип P^a/P^c) и PBC (генотип P^b/P^c).

Среди английского населения, обследованного на полиморфизм КФЭ, выявлено только пять фенотипов фермента PA, PAB, PB, PAC и PBC, наиболее распространенным оказался PB, затем PAB, PA, PBC и PAC. Это доказывало, что в генном локусе этой системы чаще встречает-

ся аллель P^b, потом P^a, аллель P^c обнаруживается сравнительно редко, вследствие чего в первых семейных обследованиях не была выявлена его гомозиготная форма P^c/P^c (фенотип PC). В дальнейшем полностью подтвердилась правильность генетической концепции в отношении трехаллельной модели наследования групп КФЭ. Так, при исследовании большого числа бразильских семей впервые был обнаружен ожидаемый фенотип PC у двух братьев, родители которых имели гетерозиготный фенотип PBC. Частота встречаемости трех основных аллелей P^a, P^b и P^c среди населения земного шара составляет в среднем соответственно 35, 60 и 5%, причем аллель P^c в негроидных и монголоидных популяциях встречается еще реже, а иногда вообще отсутствует.

Как и в большинстве других генетических детерминированных системах крови человека, в генном локусе системы КФЭ были найдены редкие атипичные аллели, обусловливающие появление необычных фенотипов. К ним относятся аллели P^r и P^d, идентифицированные сначала только у негров. Редкость подобных аллелей настолько велика, что до сих пор не выявлен ни один человек, генотипически гомозиготный по одному из этих двух атипичных аллелей, поэтому все необычные фенотипы фермента являются гетерозиготными по атипичному и одному из основных аллелей КФЭ. Атипичные гетерозиготные фенотипы КФЭ впоследствии наблюдались и среди европеоидов. Так, наследственная передача атипичных фенотипов РДА и РДВ прослеживалась в некоторых датских и шведских семьях, а редкие варианты PRA и PRB выявлены среди немцев.

На рис. 13 представлены изоферментные спектры 6 основных и трех атипичных фенотипов КФЭ. Из него видно, что аллель P^r обусловливает появление наиболее быстрых анодных, а аллель P^d наиболее медленных, мигрирующих к катоду изоферментов КФЭ. По мнению большинства исследователей, для выявления атипичных вариантов КФЭ, возникновение которых обусловлено действием атипичного аллеля P^d, необходимо соблюдать определенные условия проведения электрофореза.

Многие авторы отмечали также, что при электрофоретическом исследовании по D. Hopkinson и соавт. (1963) с использованием прерывистой трис-янтарно-цитратной буферной системы дифференцировать фенотипы PCB и PC очень трудно.

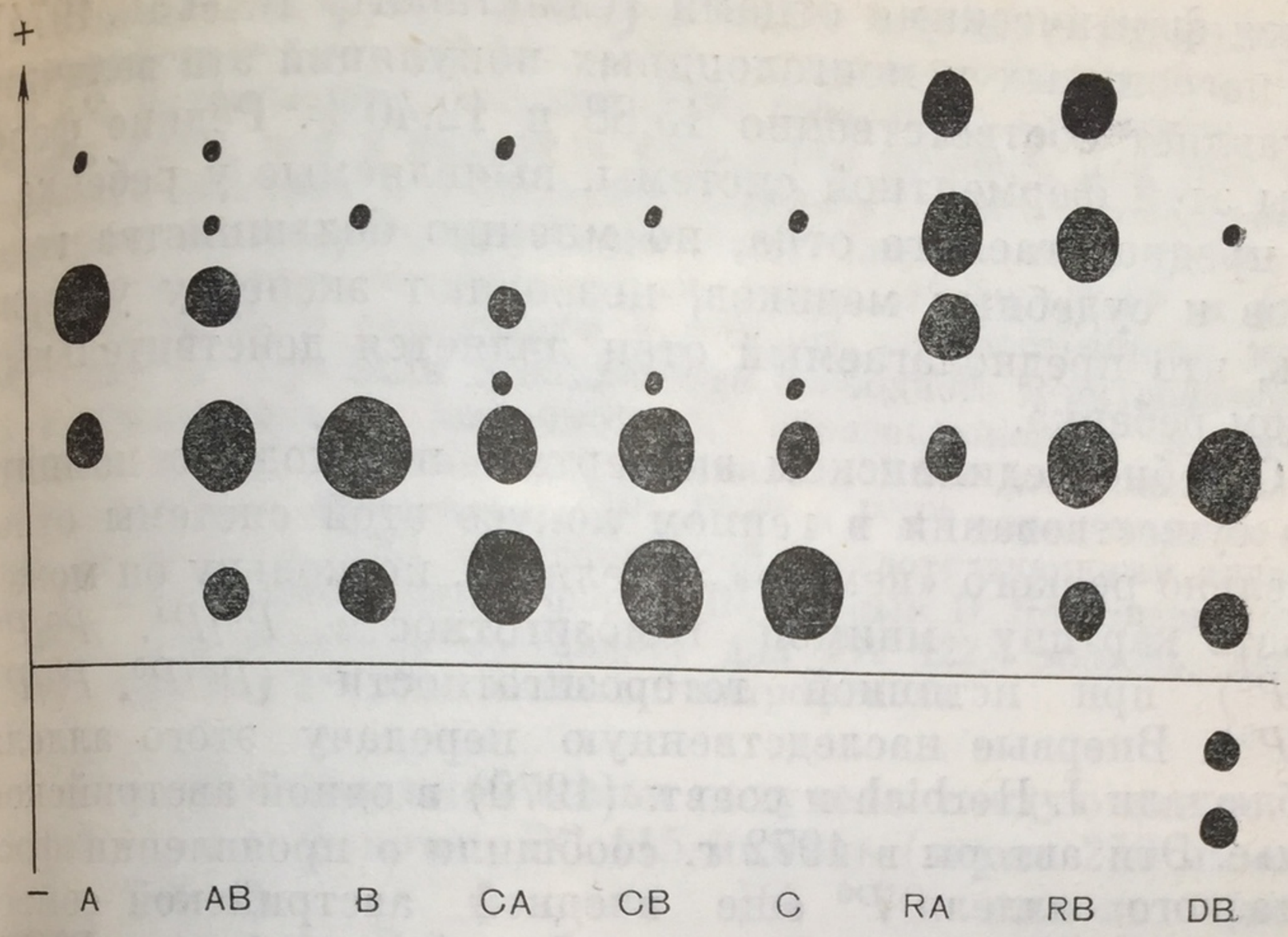


Рис. 13. Схематическое изображение фенотипов кислой фосфатазы эритроцитов.

A, AB, B, CA, CB, C — основные фенотипы; RA, RB, ДВ — атипичные фенотипы.

Для получения более четкого изоферментного спектра КФЭ G. Radam и H. Strauch (1966) рекомендуют при электрофорезе использовать прерывистую фосфат-цитратную буферную систему с pH 6,0: гелевый буфер — 0,012 М фосфатного буфера (1,43 г KH_2PO_4 + 0,56 г $NaHPO_4 \cdot 12\ H_2O$ в 1 л дистиллированной воды); электродный буфер — 0,4 М цитратного буфера [105,5 г трехзамещенного цитрата натрия (гидрат) + 8,6 г лимонной кислоты (моногидрат) в 1 л дистиллированной воды]. Наилучшее разделение изоферментов КФЭ (особенно между зонами B и C) достигается, когда в электродные ванны заливают переходный буфер различной концентрации: 0,4 М на аноде, 0,1 М на катоде. Некоторые авторы для выявления групповых изоферментов КФЭ рекомендуют использовать непрерывную буферную систему pH 5,0: на электродах 0,2 М муравьиная кислота и 0,23 М NaOH, в качестве гелевого буфера — переходный буфер с дистиллированной водой 1 : 10.

Генетически обусловленный полиморфизм системы КФЭ уже давно используется в судебно-медицинских экспертизах по делам о спорном отцовстве: значительная полиморфность системы позволяет исключить довольно высокий процент мужчин, ложно указанных в качестве отца. Весьма благоприятная частота встречаемости основных аллелей системы КФЭ, особенно среди европеоидных популяций, позволяет исключить только по одной этой системе 23,23% мужчин европеоидной расы, не являю-

щихся фактическими отцами [Chakraborty R. et al., 1974]; для негроидных и монголоидных популяций эта величина составляет соответственно 15,88 и 12,40%. Редкие фенотипы этой ферментной системы, выявляемые у ребенка и его предполагаемого отца, по мнению большинства генетиков и судебных медиков, позволяют эксперту утверждать, что предполагаемый отец является действительным отцом ребенка.

Судебно-медицинским экспертам необходимо помнить и о существовании в генном локусе этой системы относительно редкого «немого» аллеля P^0, поскольку он может давать картину мнимой гомозиготности P^a/P^a, P^b/P^b, P^c/P^c) при истинной гетерозиготности (P^a/P^0, P^b/P^0, P^c/P^0). Впервые наследственную передачу этого аллеля наблюдали J. Herbich и соавт. (1970) в одной австрийской семье. Эти авторы в 1972 г. сообщили о проявлении фосфатазного аллеля P^0 еще в одной австрийской семье. В обеих семьях были лишь гетерозиготные формы P^0/P^a, P^0/P^b и P^0/P^c, кровь их носителей хотя и давала электрофоретическую картину обычных гомозиготных фенотипов PA, PB и PC, но характеризовалась сниженной на 40—46% активностью КФЭ. В настоящее время описано уже много семей с наследственной передачей «немого» аллеля P^0. Предполагают, что этот аллель встречается не так редко. Позднее семьи, в которых прослеживалась передача аллеля P^0, наблюдал P. Nezbeda (1979).

Случай, описанный P. Nezbeda (1979), особенно поучителен для судебных медиков, использующих полиморфную систему КФЭ в экспертизах спорного происхождения детей. Автор обнаружил семью, в которой отец имел фенотип PC, а мать — PAB. По всем генетическим законам, учитывающим простой аутосомальный и кодоминантный порядок наследования групп КФЭ, у такой родительской пары могли родиться дети только с двумя возможными фенотипами PAC и PBC. Однако в этой семье было четверо детей с фенотипами PA, PB, PA и PAC, т. е. по фенотипам КФЭ трех первых детей отцовство мужа относительно этих детей должно было быть исключено. Поскольку в данном случае не было никаких сомнений в том, что все четыре ребенка родились от данной супружеской пары, было высказано предположение о наследственной передаче «немого» аллеля P^0 (это и было доказано с помощью количественного анализа активности КФЭ у отца и трех первых детей).

Гемолизаты эритроцитов отца и трех первых детей подвергали электрофорезу на ПААГ (7%) в цитратно-фосфатном буфере pH 5,9. Интенсивность окрашивания групповых изоферментов оказалась ниже, чем у матери и четвертого ребенка. Для того чтобы доказать действие в этой семье аллеля P^0 и его наследственную передачу от гетерозиготного по этому аллелю отца (P^0/P^c) первым трем также гетерозиготным детям (P^0/P^a, P^0/P^b и P^0/P^a), активность КФЭ определяли с помощь количественного метода. Активность выражали в количестве свободного п-нитрофенола на 1 г гемоглобина (в микромолях), образовавшегося в течение 30 мин при 37 °С. Снижение активности КФЭ (в процентах) при гетерозиготных фенотипах P^0/P^c, P^0/P^a и P^0/P^b определяли по средней активности КФЭ, обусловленной соответствующими аллелями P^a, P^b и P^c в гомозиготной форме. По данным D. Hopkinson и соавт. (1963), эта величина составляет для РА 122,4 мкмоль, для РВ 188,3 мкмоль и РС 256,3 мкмоль п-нитрофенола.

Для обследованной семьи получены следующие результаты: отец — фенотип РС 115 мкмоль (норма 256 мкмоль), 1-й ребенок — фенотип РА 70 мкмоль (норма 122,4 мкмоль), 2-й ребенок — фенотип РВ 81 мкмоль (норма 188,3 мкмоль), 3-й ребенок — фенотип РА 56 мкмоль (норма 122,4 мкмоль), мать — фенотип РАВ 156 мкмоль (норма 155,3 мкмоль), 4-й ребенок — фенотип РАС 178 мкмоль (норма 186,2 мкмоль). Таким образом, точный количественный учет активности КФЭ у всех членов данной семьи отчетливо продемонстрировал резкое снижение (с 48 до 57%) этого показателя у якобы фенотипически гомозиготных по типам КФЭ отца и первых трех детей при нормальной (или почти нормальной) активности фермента у действительно фенотипически гетерозиготных матери и ее четвертого ребенка.

P. Nezbeda наблюдал наследственную передачу аллеля P^0 и в следующем поколении описанной выше семьи. Первый ребенок — дочь, имевшая якобы гомозиготный фенотип РА и вышедшая замуж за мужчину с гомозиготным фенотипом РВ, должна бы иметь детей (если бы она на самом деле была гомозиготной P^a/P^a) только с фенотипом РАВ. Однако у нее родились двое детей с фенотипом РВ, причем активность КФЭ у детей равнялась 84 и 80 мкмоль (норма 188,3 мкмоль). Это доказывает наследственную передачу аллеля P^0 от гетерозиготной по этому аллелю матери (P^0/P^a) двум также гетерозиготным (P^0/P^b) детям.

Все эти обстоятельства должны всегда учитывать судебно-медицинские эксперты, использующие генетически детерминированный полиморфизм этой эритроцитарной

ферментной системы в экспертизах спорного происхождения детей. Во всех случаях «исключения» возможности рождения ребенка от конкретной родительской пары (имеется в виду «противоположная» гомозиготность по типам КФЭ у предполагаемого отца и ребенка, а также ребенка и его матери) эксперт должен обратить внимание в первую очередь на выраженность групповых изоферментных спектров у ребенка и его предполагаемого отца (или матери). Резкое снижение такой выраженности может свидетельствовать о наследственной передаче «немого» аллеля P^0. В подобных случаях необходимо проводить количественный анализ фосфатазной активности эритроцитов крови не только у всех проходящих по делу лиц, но и (если это возможно) у их ближайших родственников.

Глава 18

СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ФОСФОГЛЮКОМУТАЗЫ

Фосфоглюкомутаза (ФГМ) (КФ 2.7.5.1) является фосфотрансферазой, катализирует перенос фосфатной группы глюкозы из положения 1 в положение 6. Фермент широко распространен в живой природе, играет большую роль в метаболизме углеводов. Его активность проявляется не только в эритроцитах крови человека, но и различных органах и тканях, а также в некоторых выделениях.

Впервые генетически обусловленную гетерогенность эритроцитарной ФГМ выявили N. Spencer и соавт. (1964). После электрофореза гемолизатов эритроцитов различных лиц в крахмальном геле авторы наблюдали три различных изоферментных спектра, что дало основание высказать предположение о генетической природе такой полиморфности. N. Spencer и соавт. показали, что в гемолизатах эритроцитов можно выявить семь зон активности ФМГ: a, b, c, d, e, f и g (по возрастающей скорости миграции к аноду). Обнаружены три основные группы (или фенотипы) ФГМ, обозначенные ФГМ-1, ФГМ-2-1 и ФГМ-2. Они различаются между собой только по медленно мигрирующим изоферментам зон a, b, c и d. Быстро мигрирующие изоферменты зон e. f и g давали одинаковую электрофоретическую картину для всех трех типов. Большинство исследователей при выявлении групп ФГМ с помощью электрофореза в крахмальном геле используют две основные буферные системы: непрерывную «ТЭММ»-

систему по N. Spencer и соавт. (1964) и прерывистую «ФТВ»-систему по G. Radam и H. Strauch (1969).

Электродный буфер — непрерывная «ТЭММ»-система: 0,1 М триса, 0,1 М малеиновой кислоты, 0,01 М ЭДТА-Na (этилендиаминтетраацетат натрия), 0,01 М $MgCl_2$, до pH 7,4 буфер доводят раствором NaOH. Гелевым буфером служит электродный буфер с дистиллированной водой 1 : 10.

Прерывистая «ФТВ»-система. Электродный буфер: 0,33 М триса и 0,33 М винной кислоты, pH 7,4 (27,9 г триса и 15 г винной кислоты в 1 л дистиллированной воды). Гелевый буфер: 0,33 М фосфатного буфера, pH 7,2 (12,7 г KH_2HPO_4 и 42,8 г Na_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды). Этот основной 0,33 М фосфатный буферный раствор используют для получения гелевого буфера и непосредственно перед употреблением его разводят до концентрации 0,0029 М.

Электрофорез проводят при 4 °С — минус 6 °С в течение 16—18 ч при напряжении 5—5,5 В/см^2.

Активность ФГМ определяют в инкубационной смеси: 100 мл 0,2 М трис-HCl буфера, pH 8,0, содержащего 600 мг глюкозо-1-фосфата (Г1Ф) в виде натриевой или калиевой соли, 200 мг $MgCl_2$, 20 мг НАДФ, 20 мг феназинметасульфата (ФМС), 20 мг тиазолиевого или тетразолиевого МТТ (МТТ), 10 мкл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) (0,4—1,0 ед). Инкубацию проводят при 37 °С в течение $1^1/_2$—2 ч до появления фиолетовых зон формазана в местах расположения электрофоретически разделенных групповых изоферментов ФГМ.

Для экономии дефицитных реагентов, входящих в состав инкубационной смеси, предложено использовать метод агаровой аппликации. Инкубационную смесь, состоящую из 25 мл 0,06 М трис-HCl буфера с pH 8,0 (6 мг НАДФ, ФМС и МТТ; 50 мг Г1Ф; 20 мг $MgCl_2$ и 5 мкл Г6ФД), нагревают до 37 °С и смешивают с 25 мл 2% водного раствора агара, находящегося при температуре 50—55 °С. Затем смесь немедленно выливают тонким слоем на поверхность геля, продольно разрезанного в местах расположения изоферментов ФГМ, на участке 8—10 см к аноду от стартовых лунок. После наложения агаровой аппликации гель помещают во влажную камеру и инкубируют при 37 °С до появления фиолетовых зон в местах проявления активности ФГМ.

А. С. Гладких, А. В. Тюрин (1975) и А. В. Тюрин (1979) показали, что при использовании непрерывной «ТЭММ»-буферной системы изоферменты ФГМ лучше разделяются тогда, когда для приготовления гелевого буфера электродный буфер разводят дистиллированной водой в соотношении не 1 : 10, а 1 : 15. При применении прерывистой «ФТВ»-системы наилучшее разделение достигалось в том случае, если на катоде используют трис-винный электролит с 0,46 М триса и 0,2 М винной кислоты, а на аноде — в 2 раза меньшую концентрацию электролита. Для выявления группового полиморфизма ФГМ применяют и другие виды электрофореза: в гелях агара, агарозы,

ПААГ и на ацетатцеллюлозных мембранах [Гладких А. С. и др., 1976; Тюрин А. В., 1978; Brinkmann B. et al., 1971].

С помощью семейных обследований доказана генетическая обусловленность полиморфизма ФГМ. Появление трех фенотипов фермента (двух гомозиготных ФГМ-1 и ФГМ-2 и одного гетерозиготного ФГМ-2-1) обусловлено действием в генном локусе этой системы двух аутосомальных аллельных генов, обозначенных $ФГМ^1$ и $ФГМ^2$.

Уже при открытии изоформ ФГМ N. Spencer и соавт. (1964) обратили внимание на то, что у быстро мигрирующих вариантов ФГМ (e, f и g) не было полиморфности во всех трех типах ФГМ. На основании этого авторы предположили, что их появление контролируется другим, по-видимому, мономорфным генным локусом, обозначенным $ФГМ_2$. В соответствии с этим генный локус, аллели которого обусловливали полиморфизм ФГМ, назвали локусом $ФГМ_1$, а два его основных аллеля — аллелями $ФГМ^1{}_1$ и $ФГМ^2{}_1$. Дальнейшие исследования показали, что в генном локусе $ФГМ_1$, помимо двух основных аллелей $ФГМ^1{}_1$ и $ФГМ^2{}_1$, содержатся редкие атипичные аллели, которые обозначили $ФГМ^3{}_1$ — $ФГМ^8{}_1$. Эти аллели чаще находятся в генотипической комбинации с одним из основных аллелей. Таким образом, даже один генный локус $ФГМ_1$ теоретически может обусловливать появление 36 возможных фенотипов этой ферментной системы. На практике же в основном встречаются атипичные фенотипы ФГМ, гетерозиготные по атипичному и одному из основных аллелей данного локуса, хотя уже найдены и редкие фенотипы, генотипически являющиеся гомо- или гетерозиготными по атипичным аллелям генного локуса $ФГМ_1$ (например, фенотипы ФГМ-3-5, ФГМ-4-4 и др.).

О правильности генетической гипотезы N. Spencer и соавт. (1964) о существовании двух генных локусов системы ФГМ свидетельствует обнаружение генетически обусловленных вариантов фермента, различающихся только по быстро мигрирующим изоферментам e, f и g. По фамилии членов семьи, у которых впервые были выявлены эти атипичные наследуемые варианты ФГМ, их обозначили фенотипами ФГМ-1 (Atkinson) и ФГМ-2-1 (Atkinson). В настоящее время доказано, что в генном локусе $ФГМ_2$, кроме основного аллеля $ФГМ^1{}_2$, имеется еще по крайней мере четыре редких атипичных аллеля: $ФГМ^2{}_2$ — $ФГМ^5_2$. Эти аллели теоретически могут обусловливать появление еще 15 различных фенотипов $ФГМ_2$.

Таким образом, система ФГМ является довольно сложной и полиморфной генетически детерминированной ферментной системой: во-первых, контролируется многочисленными алллеями в различных генных локусах, и, во-вторых, в каждом локусе имеются довольно редкие аллели, которые в комбинации с основными аллелями этой системы или в комбинации друг с другом обусловливают появление большого числа так называемых атипичных фенотипов ФГМ.

Большой научный и практический интерес вызвало открытие в плаценте, фибробластах и лейкоцитах крови человека генетически обусловленных вариантов ФГМ, не связанных с эритроцитарным полиморфизмом фермента. Поскольку данный полиморфизм не совпадал с эритроцитарными фенотипами ФГМ, контролируемыми аллелями генных локусов $ФГМ_1$ и $ФГМ_2$, было высказано логическое предположение о существовании третьего генного локуса системы ФГМ, обозначенного локусом $ФГМ_3$. Доказан простой кодоминантный порядок наследования лейкоцитарных, плацентарных или фибробластных групп ФГМ. Это свидетельствует о существовании в генном локусе $ФГМ_3$ двух кодоминантных аллелей; их обозначили $ФГМ^1{}_3$ и $ФГМ^2{}_3$. Эти аллели обусловливают генетическую реализацию трех фенотипов $ФГМ_3$, два из которых ($ФГМ_3$-1 и $ФГМ_3$-2) гомозиготны по соответствующим аллелям, а один ($ФГМ_3$-2-1) — гетерозиготен. Каких-либо редких атипичных аллелей в генном локусе $ФГМ_3$ в отличие от генных локусов $ФГМ_1$ и $ФГМ_2$ до сих пор не обнаружено.

Три генных локуса системы ФГМ не являются тесно сцепленными. Более того, установлено, что генные локусы этой системы располагаются даже не на одной и той же аутосомальной хромосоме, а на различных аутосомах. В настоящее время известно, что генные локусы системы $ФГМ_1$ и системы ФГД находятся либо на коротком плече, либо на проксимальном участке длинного плеча хромосомы № 1, в то время как генный локус системы тканевых антигенов HLA и генный локус $ФГМ_3$ сцеплены и располагаются на хромосоме № 6.

Судебно-медицинские эксперты, использующие генетически обусловленный полиморфизм системы ФГМ в экспертизах спорного отцовства, должны помнить, что групповые изоферменты a, b, c, d, e, f и g, являющиеся генетическими продуктами аллелей генных локусов $ФГМ_1$ и

$ФГМ_2$, полиморфны не только в эритроцитах крови, но и во всех тканевых клетках и большинстве выделений человека [Гладких А. С., 1976; Гладких А. С., Гадакчян Д. Г., Тюрин А. В., 1976; Гладких А. С., Тюрин А. В., 1976], а полиморфизм системы $ФГМ_3$ проявляется в лейкоцитах, фибробластах и плаценте. Это связано в первую очередь с тем, что подавляющая часть активности ФГМ контролируется локусами $ФГМ_1$ и $ФГМ_2$ (90—96% всей активности), а 5—10% активности — локусом $ФГМ_3$. В последние годы, правда, появились сообщения о возможности выявления группового полиморфизма $ФГМ_3$ в лизатах сперматозоидов, а также эритроцитах крови человека, что представляет несомненный интерес с судебно-медицинской точки зрения.

Перспективность выявления групп $ФГМ_3$ в сперме и крови человека для нужд судебной медицины очевидна. Поэтому при экспертизах желательно, по-видимому, не только использовать повышенную концентрацию реагентов, выявляющих активность ФГМ (в первую очередь глюкозо-1,6-дифосфата), но и применять неспецифические активаторы фермента типа неионных детергентов (тритон X-100), а также некоторые меркаптосоединения [Тюрин А. В., 1979].

Высокая частота встречаемости основных аллелей ФГМ в генных локусах $ФГМ_1$ и $ФГМ_3$ (аллелей $ФГМ^1{}_1$ и $ФГМ^2{}_1$, $ФГМ^1{}_3$ и $ФГМ^1{}_3$) среди населения Земного шара позволяет использовать полиморфизм этой ферментной системы в судебно-медицинских экспертизах, проводимых в делах, связанных со спорным происхождением ребенка. Например, вероятность исключения мужчины, не являющегося отцом ребенка, по одной только системе $ФГМ_1$ в трех расовых группах, по данным R. Chakraborty и соавт. (1974), составляет 14,57; 14,76 и 13,44% соответственно для европеоидных, монголоидных и негроидных популяций.

Средняя вероятность исключения отцовства только по одной системе $ФГМ_3$ среди этих популяций также достаточно велика: соответственно 15,54; 13,06 и 17,40%. Естественно, что одновременное выявление группового ферментного полиморфизма генных локусов $ФГМ_1$ и $ФГМ_3$ в гемолизатах эритроцитов и лейкоцитов крови проходящих по делу лиц значительно повысит информативность этой системы в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства.

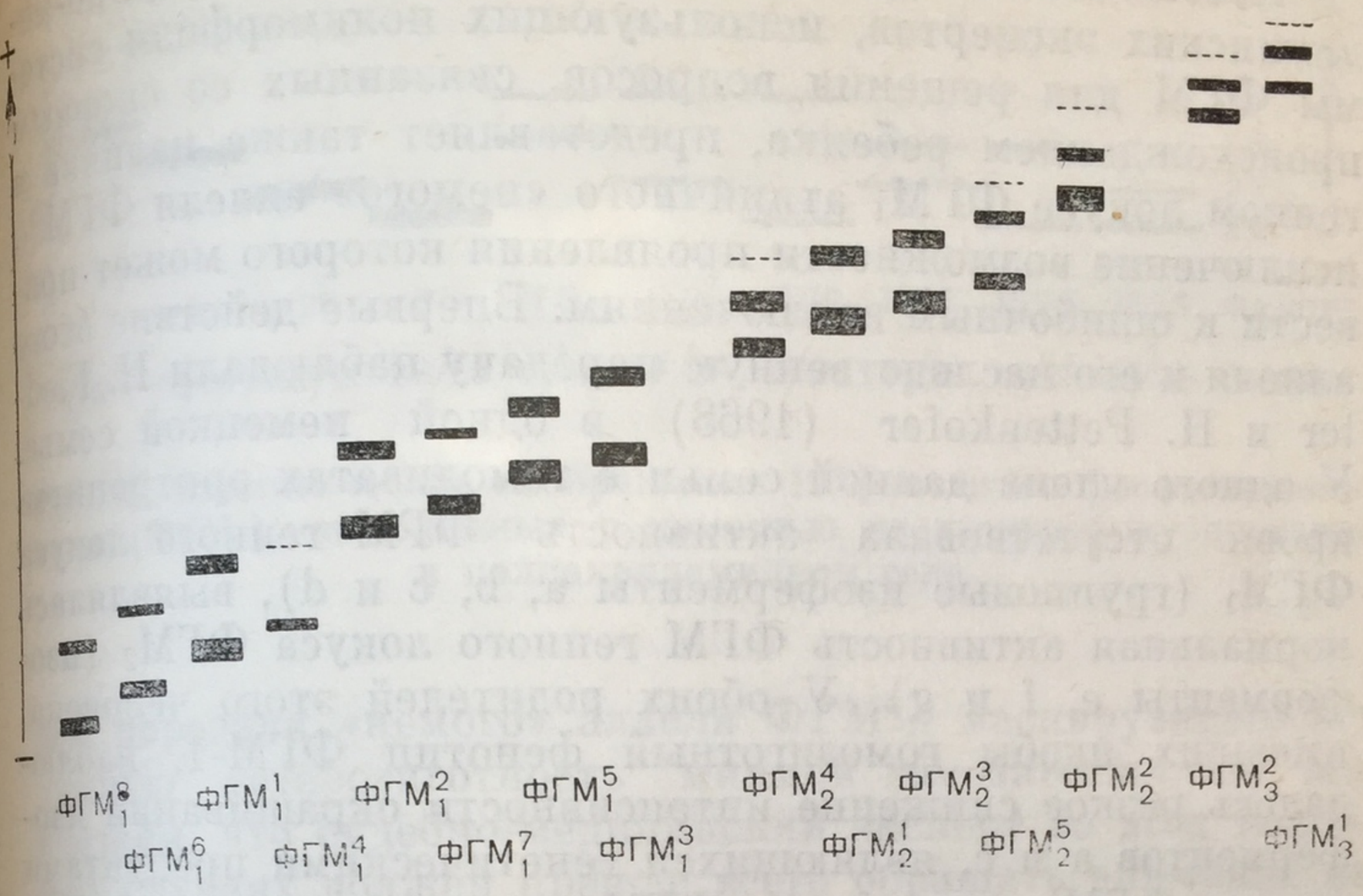


Рис. 14. Схематическое изображение генетических продуктов трех генных локусов *ФГМ*$_1$, *ФГМ*$_2$, *ФГМ*$_3$ [Hopkinson D., Harris H., 1968].

Для выявления полиморфизма ФГМ$_3$ в лейкоцитах нужно не менее 13 мл цельной крови, поэтому кровь у всех проходящих по делу лиц берут не из пальца, как обычно, а из вены. Для получения лейкоцитарной пленки кровь гепаринизируют и длительно центрифугируют. В результате на поверхности крови образуется белая пленка или слой лейкоцитов, его осторожно снимают и обрабатывают ультразвуком для получения лизатов лейкоцитов.

Главными условиями для четкого выявления групповых изоферментов ФГМ$_3$, обладающих очень низкой активностью и очень высокой скоростью миграции, следующие. Во-первых, электрофоретическое разделение нужно проводить в очень длинном (около 40 см) крахмально-гелевом блоке в течение довольно продолжительного времени (18—20 ч) при высоком градиенте напряжения (6—7 В/см). Во-вторых, из-за низкой активности изоферментов ФГМ$_3$ в буферные растворы прерывистой «ТЭММ»-буферной системы непосредственно перед электрофорезом добавляют значительное количество Г1Ф, содержащего следы Г16ДФ, и НАДФ.

Частота встречаемости основных аллелей генных локусов ФГМ$_1$ и ФГМ$_3$ среди различных популяций варьирует незначительно и составляет в среднем для аллелей ФГМ$^1_1$ 75%, ФГМ$^2_1$ 25%, ФГМ$^1_3$ 70% и ФГМ$^2_3$ 30%.

Схематическое изображение групповых изоферментов ФГМ, являющихся генетическими продуктами основных и атипичных аллелей всех трех генных локусов ФГМ$_1$, ФГМ$_2$ и ФГМ$_3$, представлено на рис. 14.

Несомненный практический интерес для судебно-медицинских экспертов, использующих полиморфизм системы ФГМ для решения вопросов, связанных со спорным происхождением ребенка, представляет также наличие в генном локусе $ФГМ_1$ атипичного «немого» аллеля $ФГМ^0_1$, исключение возможности проявления которого может привести к ошибочным заключениям. Впервые действие этого аллеля и его наследственную передачу наблюдали H. Fiedler и H. Pettenkofer (1968) в одной немецкой семье. У одного члена данной семьи в гемолизатах эритроцитов крови отсутствовала активность ФГМ генного локуса $ФГМ_1$ (групповые изоферменты a, b, c и d), выявлялась нормальная активность ФГМ генного локуса $ФГМ_2$ (изоферменты e, f и g). У обоих родителей этого человека, имевших якобы гомозиготный фенотип ФГМ-1, наблюдалось резкое снижение интенсивности окрашивания изоферментов a и c, являющихся генетическими продуктами аллеля $ФГМ^1_1$, активность ФГМ оказалась почти в 2 раза меньше, чем в норме. Эти наблюдения, без сомнения, свидетельствовали о том, что отец и мать этого необычного по группам ФГМ лица были генотипически гетерозиготными по обычному аллелю $ФГМ^1_1$ генного локуса $ФГМ_1$ и аллелю $ФГМ^0_1$ этого локуса. Очевидно также, что своему ребенку отец и мать передали по наследству аллель $ФГМ^0_1$; их сын был генотипически гомозиготным $ФГМ^0_1/ФГМ^0_1$ по этому «немому» аллелю и обладал необычным фенотипом ФГМ-0.

G. Wendt и соавт. (1971) описали случай «противоположной» исключающей гомозиготности по аллелям ФГМ у одной женщины и ее дочери, причем возможность перепутывания ребенка в родильном доме полностью исключалась. Дочь имела слабовыраженый фенотип ФГМ-2, ее мать — слабовыраженный фенотип ФГМ-1, ее отец — нормальный фенотип ФГМ-2. Авторы также высказали предположение о наследственной передаче в этой семье «немого» аллеля от матери к дочери, правильность которого в дальнейшем была доказана обследованием родителей матери ребенка.

Поскольку частота встречаемости «немого» аллеля $ФГМ^0_1$ среди различных популяций еще не выяснена, по мнению O. Prokop и W. Göhler (1976), судебно-медицинским экспертам в случаях исключения отцовства или материнства по противоположной гомозиготности в системе $ФГМ_1$ всегда надо помнить о возможности наследствен-

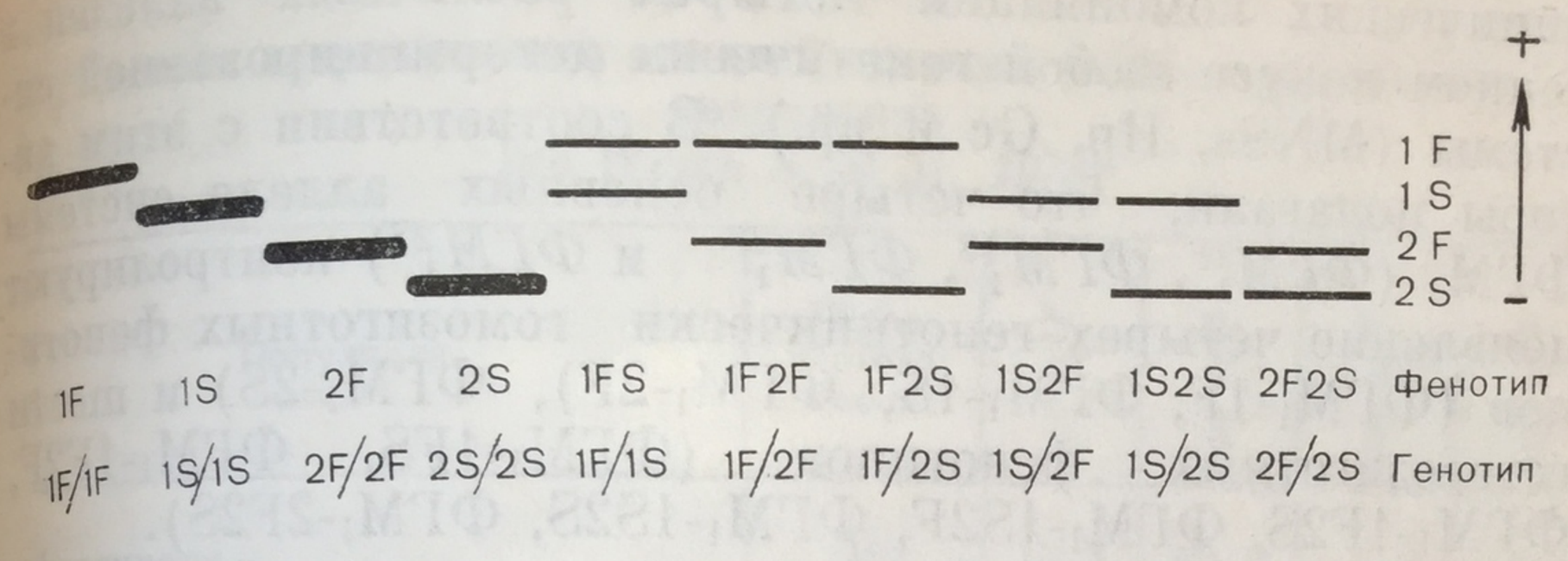


Рис. 15. Схематическое изображение 10 фенотипов фосфоглюкомутазы ($ФГМ_1$), выявляемых с помощью изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле.

ной передачи «немого» аллеля $ФГМ^0{}_1$, маскирующего истинную гетерозиготность мнимой гомозиготностью. Мы считаем, что судебно-медицинский эксперт во всех подобных случаях должен прежде всего обращать внимание на активность групповых изоферментов $ФГМ_1$ у ребенка и его предполагаемого отца или у ребенка и его матери. При снижении интенсивности окрашивания групповых изоферментов ФГМ необходимо провести количественный анализ активности ФГМ в эритроцитах крови проходящих по делу лиц, а также расширенное исследование групп ФГМ у ближайших родственников «исключенных» отца или матери.

Через 12 лет после открытия генетически детерминированного полиморфизма эритроцитарной ФГМ локуса $ФГМ_1$ и признания правильности формально-генетической гипотезы наследования групп $ФГМ_1$ J. Bark и соавт. (1976) с помощью изоэлектрического фокусирования на ПААГ-пластинах выявили «расширенную» полиморфность в зоне миграции четырех групповых изоферментов $ФГМ_1$ (a, b, c и d), выявляемых электрофорезом в геле крахмала. Авторы обнаружили 10 различных комбинаций этих изоферментов (рис. 15). На основании наблюдений они предположили, что в генном локусе $ФГМ_1$ существуют не два, а четыре основные аллеля: $ФГМ_1^{1F}$, $ФГМ_1^{1S}$, $ФГМ_1^{2F}$ и $ФГМ_1^{2S}$. В 10 различных комбинациях изоферментов были отмечены четыре единичные изофермента $ФГМ_1$ с различной скоростью миграции и 6 различных парных комбинаций, в которых каждый изофермент $ФГМ_1$ обладал тождественной скоростью миграции с одним из четырех указанных выше изоферментов. С другой стороны, число 10 как раз и соответствовало числу возможных парных гено-

типических комбинаций четырех различных аллелей в генном локусе любой генетически детерминированной системы (MNSs, Hp, Gc и др.). В соответствии с этим авторы полагали, что четыре основных аллеля системы ФГМ$_1$ ($ФГМ_1^{1F}$, $ФГМ_1^{1S}$, $ФГМ_1^{2F}$ и $ФГМ_1^{2S}$) контролируют появление четырех генотипически гомозиготных фенотипов (ФГМ$_1$-1F, ФГМ$_1$-1S, ФГМ$_1$-2F), ФГМ$_1$-2S) и шести гетерозиготных фенотипов (ФГМ$_1$-1FS, ФГМ$_1$-1F2F, ФГМ$_1$-1F2S, ФГМ$_1$-1S2F, ФГМ$_1$-1S2S, ФГМ$_1$-2F2S).

Правильность новой формально-генетической гипотезы наследования групп ФГМ$_1$ в настоящее время доказана не только многочисленными семейными обследованиями, но и исследованиями пар мать — ребенок, гомозиготных близнецов, а также популяционно-генетическими обследованиями. Результаты последних свидетельствуют о тождественной частоте встречаемости в конкретной популяции двух «прежних» аллелей $ФГМ^1{}_1$ и $ФГМ^2{}_1$ и четырех «новых» аллелей $ФГМ_1^{1F}$, $ФГМ_1^{1S}$, $ФГМ_1^{2F}$ и $ФГМ_1^{2S}$ (имеется в виду сравнение суммарной частоты встречаемости «прежнего» аллеля $ФГМ^1{}_1$ и соответственно суммарной частоты встречаемости двух «новых» аллелей $ФГМ_1^{2F}$ и $ФГМ_1^{2S}$ с частотой встречаемости «прежнего» аллеля $ФГМ^2{}_1$).

S. Welch (1978) наблюдал 33 так называемые «критические» родительские пары, в которых оба родителя имели соответствующие гомозиготные фенотипы ФГМ$_1$ (29 родительских пар 1S×1S, одна родительская пара 1F×1F и 3 родительских пары 1S×2S). Все 69 детей, родившихся в этих семьях, имели единственно возможный для них гомо- или гетерозиготный фенотип ФГМ$_1$ (59 детей с фенотипом 1S, 3 детей с фенотипом 1F и 7 детей с фенотипом 1S2S).

Частота встречаемости четырех основных аллелей системы ФГМ$_1$ среди различных популяций представлена в табл. 19.

Хотя «расширенный» полиморфизм эритроцитарной ФГМ генного локуса $ФГМ_1$ был открыт с помощью изоэлектрического фокусирования на ПААГ-пластинах, многие исследователи предприняли попытку использовать для этого обычные электрофоретические методы исследования. Так, P. Kühnl и соавт. (1977) удалось впервые обнаружить полиморфизм $ФГМ_1$ с помощью электрофореза в геле агарозы (результаты параллельного исследования одних и тех же образцов гемолизатов эритроцитов крови

Таблица 19

Частота встречаемости аллелей системы ФГМ$_1$ в различных популяциях

[*по Welch S. et al., 1978*]

Популяция	Число обследованных	$ФГМ^{1F}$	$ФГМ^{1S}$	$ФГМ^{2F}$	$ФГМ^{2S}$
Англичане	154	10,1	69,2	6,2	14,6
Англичане	123	11,4	63,4	6,9	18,3
Англичане	102	12,2	61,8	11,8	14,2
Англичане	1888	13,4	62,4	6,2	18,0
Немцы (ФРГ)	291	14,3	61,9	6,7	17,2
Немцы (ФРГ)	329	12,3	65,0	5,2	17,5
Ньюфаундлендцы	300	15,0	54,7	7,1	23,2
Негритянское население	246	13,2	68,1	2,8	15,9
Гамбийцы	637	5,3	79,5	1,9	13,3
Индийцы	88	10,2	53,4	9,7	26,7

электрофоретическим и изоэлектрофокусическим методами были тождественными). Большой интерес представляют данные, полученные Bissbort и соавт. (1978).

Гемолизаты готовили путем трехкратного отмывания эритроцитов изотоническим раствором NaCl, центрифугирования, разрушения осадка толуолом и последующего повторного центрифугирования. Для электрофореза использовали непрерывную трис-гистидиновую буферную систему с pH 5,9. Электродный буфер: 0,25 М триса и 0,55 М водного раствора хлорида гистидина, доведенного до pH 5,9 1 NHCl. Гелевый буфер: электродный буфер, разведенный дистиллированной водой 1 : 35. Электрофорез проводили при +4—6 °С 20—24 ч, напряжение 9 В/см. Зоны активности изоферментов определяли по методу N. Spencer et al. (1964), используя агаровую аппликацию.

При такой технике электрофоретического исследования авторы отчетливо выявили все десять возможных фенотипов ФГМ$_1$, каждому из которых соответствовала единственно возможная для него генотипическая комбинация. При этом групповые изоферменты ФГМ$_1$ мигрировали от старта не к аноду, как обычно, а к катоду, в то время как изоферменты, являющиеся генетическими продуктами генного локуса *ФГМ*$_2$, обладали анодной электрофоретической подвижностью. Наибольшей скоростью миграции к катоду обладал изофермент, являющийся генетическим продуктом аллеля $ФГМ_1^{1F}$ затем — аллелей $ФГМ_{1S}^{1}$ $ФГМ_1^{2F}$ и $ФГМ_1^{2S}$. Так же как и при изоэлектрическом

фокусировании, на ПААГ-пластинах при электрофоретическом разделении в кислом крахмальном геле в гомозиготных фенотипах обнаруживались четыре одиночных изофермента, обладающих различной скоростью миграции к катоду, а в шести гетерозиготных фенотипах — соответствующие парные изоферменты с той или иной электрофоретической подвижностью.

Таким образом, уже сейчас судебно-медицинские эксперты при проведении экспертиз спорного отцовства могут выявлять «расширенный» генетический детерминированный ферментный полиморфизм эритроцитарной $ФГМ_1$, используя при этом совсем не сложный метод горизонтального электрофореза в кислом крахмальном геле. Такое исследование по сравнению с обычным электрофорезом, позволяющим дифференцировать только три стандартные фенотипа $ФГМ_1$-1, $ФГМ_1$-2-1 и $ФГМ_1$-2, повысит вероятность исключения мужчин, не являющихся отцами того или иного ребенка, только по одной этой ферментной системе с 13—14 до 25—26%.

Глава 19
СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ АДЕНИЛАТКИНАЗЫ

Аденилаткиназа (АК) (КФ 2.7.4.3) катализирует реакцию АТФ+АМФ=2АДФ.

Впервые генетически детерминированный полиморфизм эритроцитарной аденилаткиназы (АК) описали R. Fildes и H. Harris (1966). Авторы применили метод электрофореза в крахмальном геле с последующим выявлением активности АК. Было найдено три фенотипа АК: АК-1, АК-2-1 и АК-2. При исследовании гемолизатов эритроцитов крови не связанных родством англичан установлено, что приблизительно 90% лиц обладают фенотипом АК-1 и около 10% — фенотипом АК-2-1. Фенотип АК-2 встречается довольно редко (0,5—1%) и при первичном популяционном обследовании он был выявлен только у 5 человек.

В семейных обследованиях, а также исследованиях пар мать — ребенок выявлена строгая генетическая обусловленность вариантов АК. Не было установлено статистически достоверных различий в частоте встречаемости фенотипов АК среди лиц различного пола. Все эти данные дали возможность создать формально-генетическую

гипотезу, согласно которой варианты АК контролируются аллельными генами $АК^1$ и $АК^2$ в соответствующем аутосомальном генном локусе без доминирования. По этой гипотезе, фенотипы АК-1 и АК-2 являются гомозиготными по соответствующим аллелям, а фенотип АК-2-1 — гетерозиготным по аллелям $АК^1$ и $АК^2$.

Для выявления генетически обусловленных типов АК предложено несколько электрофоретических методов.

Метод R. Fildes и H. Harris (1966) — горизонтальный электрофорез в геле крахмала с использованием прерывистой буферной системы pH 7,0. Электродный буфер: 0,41 М лимонной кислоты в 1 л дистиллированной воды, доведенной до pH 7,0, 1 N NaOH. Гелевый буфер: 0,005 М хлорида гистидина в 1 л дистиллированной воды. Электрофорез проводят в течение 4—5 ч при напряжении 10 В/см с усиленным циркуляционным охлаждением.

Метод J. Bowman и соавт. (1967) — вертикальный электрофорез в крахмальном геле с применением непрерывной фосфатной буферной системы pH 6,2. Электродный буфер: 0,25 М фосфатный буфер. Гелевый буфер: переходный буфер, разведенный дистиллированной водой 1 : 10. Электрофорез проводят 14—16 ч при напряжении 5—6 В/см и температуре +4—6 °С.

Метод H. Sonneborn и W. Renninger (1971) — электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках или мембранах. Используют 0,02 М фосфатный буфер с pH 6,4. Электрофорез проводят 80—90 мин при напряжении на клемах 300 В.

Метод G. Bauer и соавт. (1972) — горизонтальный высоковольтный электрофорез в тонкослойном крахмальном геле с применением непрерывной фосфатной буферной системы pH 6,2. Электрофорез проводят при напряжении 12—14 В/см с усиленным циркуляционным охлаждением.

Метод G. Radam и H. Strauch (1968) — горизонтальный электрофорез в крахмальном геле при различной молярной концентрации переходного буфера на электродах. К достоинствам метода следует отнести его быстроту, четкость разделения групповых изоферментов АК, а также возможность многорядного нанесения исследуемых образцов гемолизатов в блок крахмального геля. Электродный буфер: 0,33 М фосфатный буфер pH 6,5 (31,75 г KH_2PO_4 и 17,9 г Na_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды). В катодной ванне используют этот буфер, а в анодной — разведенный до концентрации фосфатных электролитов, равной 0,066 М. В качестве гелевого буфера применяют тот же фосфатный буфер, но разведенный до концентрации электролитов, равной 0,00375 М. Электрофорез проводят 3 ч при напряжении 7 В/см и температуре +4°—6 °С.

Метод Н. Норре и соавт. (1972) — горизонтальный электрофорез в ПААГ-блоках. Доказано, что полиакриламидные гели обладают максимальной разрешающей способностью. Однако различные катализаторы и регуляторы полимеризации, входящие в состав ПААГ, резко снижают активность многих эритроцитарных ферментов (КФЭ, ФГМ, АК, ФГД, ГПТ и др.), что делает невозможным выявление их групповых изоферментов. Сильными ингибиторами ферментативной активности являются персульфат

аммония (надсернокислый аммоний), цианагум-41 и ТЭМЭД. Для устранения неблагоприятного влияния этих компонентов ПААГ на активность ферментов Н. Норре и соавт. (1972) предложили использовать предварительное диффузное промывание таких гелей в дистиллированной воде с последующим насыщением их гелевым буфером. Методика разработана для выявления в ПААГ групповых изоферментов не толькко АК, но и других эритроцитарных ферментов. Применяют 5% ПААГ, который получают при смешивании равных объемов четырех водных растворов: а) 20% раствор акриламида и 0,8% раствор N′, N′-метиленбисакриламида, б) 1,6% раствор цианагума-41 (диметиламинопропионитрил), в) 0,03% раствор красной кровяной соли (феррицианид калия), г) 0,48% раствор персульфата аммония. После заливки растворов гелевую кювету плотно закрывают притертой стеклянной пластинкой и оставляют на свету (для фотополимеризации) на 1—1½ ч. Затем кюветы с ПААГ на 12 ч помещают в сосуд с дистиллированной водой, а потом на неделю в сосуды с соответствующими гелевыми буферами, причем буферные растворы за это время меняют не менее 5 раз. Скорость промывания гелевых блоков, насыщения гелей буферными растворами зависит как от объема самих буферных растворов, так и скорости их циркуляции вокруг гелевых блоков. Готовые для электрофореза блоки полиакриламида хранят при +4°—6 °С в буферных растворах, содержащих консервант (мертиолят, азид натрия и др.).

Для электрофоретического разделения групповых изоферментов АК Н. Норре и соавт. (1972) использовали непрерывную фосфатную буферную систему, предложенную G. Radam и H. Strauch (1968), с небольшими изменениями: переходный буфер — 0,2 М натриево-калиевый фосфатный буфер pH 6,2 (на катоде), на аноде — «катодный» переходный буфер, разведенный дистиллированной водой 1 : 4. В качестве гелевого буфера использовали «катодный» переходный буфер, разведенный дистиллированной водой 1 : 10. Для электрофореза применяли ПААГ-блоки размером 20×14×0,4 см. Одновременно исследовали 30 образцов (три ряда по 10), причем стартовые щели для внесения гемолизатов располагались в 7; 12 и 18 см от катодного края гелевого блока. Электрофорез проводили 15 ч при напряжении 4 В/см и температуре +4 °С.

Активность АК выявляли, используя либо метод инкубации в жидкой реакционной среде, либо метод агаровой аппликации. В первом случае состав инкубационной среды был следующим: 100 мл 0,05 М трис-HCl-буфер (pH 7,1) содержал 20 мг нитросинего тетразолиевого (НСТ), 3 мг ФМС, 25 мг НАДФ, 90 мг глюкозы, 20 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 мг АДФ, 160 ед дрожжевой гексокиназы (0,035 мл) и 80 ед Г6ФД (0,035 мл). Время инкубации 1—1½ ч при 37 °С до появления хорошо выраженных зон фиолетового формазана, выпавшего в местах активности АК.

При агаровой аппликации использовали 20 мл 0,1 М трис-HCl-буфера (pH 8,0), добавляли в него 100 мг растворимого агара и кипятили на водяной бане до полного растворения агара. После охлаждения в раствор добавляли 40 мг глюкозы, 10 мг АДФ, 2 мг НАДФ, 2 мг ФМС, 2 мг МТТ, 0,7 ед Г6ФД и 1,4 ед гексокиназы. После растворения реагентов теплый раствор агара заливали на поверхность гелевого блока и инкубировали 20—30 мин при 37 °С.

Принцип выявления активности АК основан на следующих биохимических реакциях. К образовавшемуся в местах проявления

активности АК АТФ добавляют глюкозу, которая в присутствии гексокиназы образует АДФ и Г6Ф. Последний в присутствии Г6ФД и НАДФ образует 6-фосфоглюконат и НАДФH_2. В свою очередь восстановленная форма кофермента в присутствии ФМС и МТТ дает цветовую реакцию, конечный продукт которой — зерна нерастворимого формазана фиолетового цвета.

Кроме трех обычных фенотипов эритроцитарной АК (АК-1, АК-2-1 и АК-2), были найдены и довольно редкие атипичные варианты, передающиеся по наследству. Так, J. Bowman и соавт. (1967) описали две семьи, у членов которых наблюдалась наследственная передача двух новых необычных фенотипов фермента, названных авторами фенотипами АК-3-1 и АК-4-1. Уже само обозначение этих фенотипов свидетельствовало о том, что они генотипически являются гетерозиготными по основному, наиболее распространенному аллелю $АК^1$ и атипичным аллелям, названным соответственно аллелями $АК^3$ и $АК^4$.

Проведенные в последнее время семейные обследования свидетельствуют о возможности наследственной передачи еще одного, по-видимому, крайне редкого атипичного гетерозиготного фенотипа АК-3-2.

Спектры групповых изоферментов трех основных и двух редких атипичных фенотипов эритроцитарной АК показаны на рис. 16. При электрофорезе в крахмальном и полиакриламидном геле почти все групповые изоферменты либо располагаются около стартовых лунок, либо мигрируют с различной скоростью к аноду.

Частота встречаемости основных аллелей $АК^1$ и $АК^2$ среди различных европейских популяций отличается исключительной стабильностью, причем частота встречаемости аллеля $АК^1$ (95—97%) превалирует над частотой встречаемости аллеля $АК^2$ (2,9—4,5%). Этим объясняется значительное преобладание гомозиготного фенотипа АК-1 (90—92%) над гетерозиготным фенотипом АК-2-1 (7—7,5%) и особенно гомозиготным фенотипом АК-2 (0,1—0,5%). Популяционно-генетические исследования наследственного полиморфизма системы АК, проведенные за последнее время, показали, что среди негроидных и особенно монголоидных популяций частота встречаемости аллеля $АК^2$ значительно ниже, чем в европеоидных популяциях. Более того, например, у индейцев Северной Америки, эскимосов и лопарей аллель $АК^2$ вообще не выявлен и во всех этих популяциях в 100% случаев наблюдается гомозиготный фенотип АК-1.

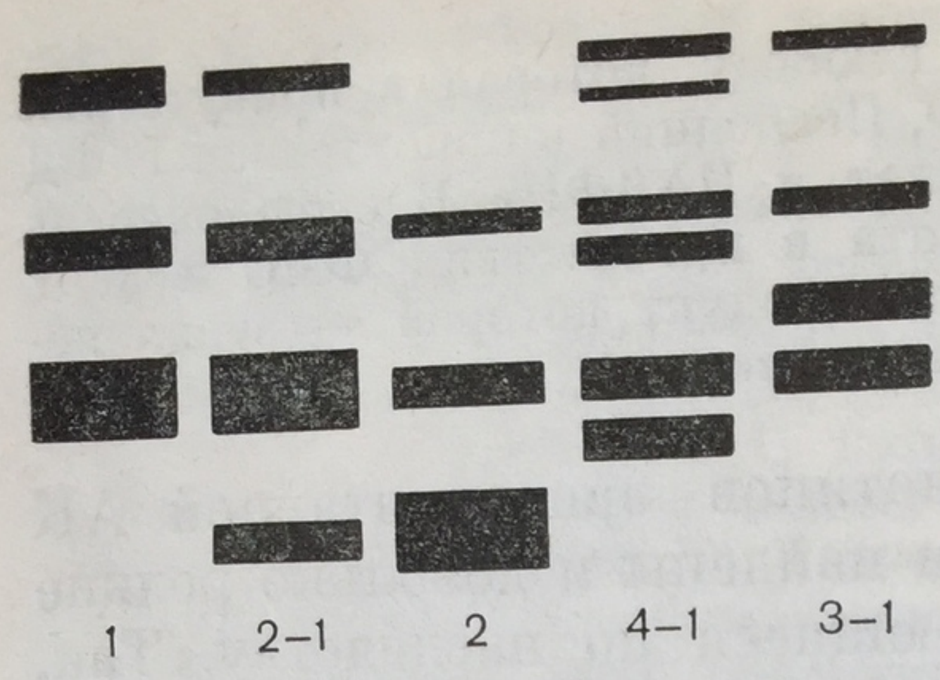


Рис. 16. Схематическое изображение трех основных (1,2-1,2) и двух атипичных фенотипов (4-1, 3-1) аденилаткиназы.

Исходя из относительной мономорфности этой эритроцитарной ферментной системы, имеющей, как мы говорим, «неблагоприятную» по информативности частоту встречаемости ее основных аллелей, вероятность исключения мужчин, ложно указанных в качестве отца того или иного ребенка, при использовании только системы АК будет довольно низкой. Например, по данным J. Bowman и соавт. (1967), для европеоидных популяций средняя процентная вероятность исключения мужчин, не являющихся отцами тех или иных детей, составляет 4,28; для негроидных и монголоидных популяций она значительно ниже и соответственно 0,59 и 0%. Однако редкие атипичные аллели этой ферментной системы ($АК^3$ и $АК^4$), обусловливающие появление редких гетерозиготных фенотипов АК-3-1, АК-4-1, АК-3-2, АК-4-2, а также еще более редких гомо- или гетерозиготных фенотипов АК-3-3, АК-4-4 и АК-3-4, могут быть использованы при условии их обнаружения у ребенка и его предполагаемого отца в качестве достоверного признака, который свидетельствует о том, что предполагаемый отец является фактическим отцом данного ребенка.

Как и в большинстве других генетически детерминированных системах крови человека, в генном локусе ферментной системы АК выявлен довольно редкий атипичный «скрытый» или «немой» аллель $АК^0$, генетически не реализующий появление групповых изоферментов АК, а, следовательно, снижающий активность АК приблизительно в 2 раза при условии его гетерозиготности с одним из основных аллелей $АК^1$ или $АК^2$ этой системы. Таким образом, при исключении возможности отцовства или материнства по этой ферментной системе в случаях противоположной гомозиготности системы АК у ребенка и его предполагаемого отца (или матери) судебно-медицинский эксперт должен обращать внимание на выраженность групповых изоферментов АК в противоположных гомозиготных фенотипах системы для того, чтобы не «пропус-

тить» истинную гетерозиготность ($АК^1/АК^0$ или $АК^2/АК^0$), маскирующуюся гомозиготностью ($АК^1/АК^1$ или $АК^2/АК^2$). При подозрении на действие в обследуемой семье аллеля $АК^0$ эксперт должен провести количественный анализ активности АК у всех проходящих по делу лиц, а если это возможно, и у их ближайших родственников.

Определенный интерес для генетиков и судебных медиков представляют наблюдения Ch. Salmon и соавт. (1968). В крови одной женщины, не имевшей в анамнезе гемотрансфузий, авторы нашли эритроциты с различной групповой характеристикой по системе АВ0 и АК. Одна группа эритроцитов крови этой жещины содержала «сильный» антиген A_1 и имела аденилаткиназный фенотип АК-2-1, в другой группе эритроцитов находился исключительно «слабый» антиген А (близкий к A_x) и они относились к фенотипу АК-1. По 13 другим эритроцитарным системам крови обе группы эритроцитов были однородными. На протяжении 6 лет наблюдения первая популяция эритроцитов (A_1, АК-2-1) составляла в разные годы 33,51—44% всей массы эритроцитов. Эти наблюдения, несомненно, свидетельствуют о тесном сцеплении генных локусов систем АВ0 и АК и расположении их на одной и той же аутосомальной хромосоме. По-видимому, у данной женщины в определенный период по каким-то причинам произошел перекрест хромосом (кроссинговер) и в результате наступило мутационное изменение некоторых наследственных признаков. В дальнейшем в результате многократных митозов нормальной и мутантной клетки возникли два клеточных клона, один из которых обусловливал продукцию нормальных эритроцитов крови, а другой обладал свойствами мутантной клетки. Дальнейшие исследования полностью подтвердили генетическую корреляцию генных локусов систем АВ0 и АК.

Итак, в настоящее время основным методом определения групп АК остается электрофорез в крахмальном геле с различными модификациями. Разрешающая способность метода позволяет эксперту четко диагностировать три основных фенотипа этой системы. Однако для выявления атипичных фенотипов АК 1-го генного локуса этой системы, а также фенотипов АК 2-го и 3-го генных локусов, открытых сравнительно недавно, разрешающая способность метода, по мнению некоторых авторов, может быть недостаточной для проведения экспертизы.

В последние годы разработаны и другие методы электрофоретического разделения изоферментов АК: на ацетатцеллюлозных мембранах, целлогеле и в тонком слое геля агарозы [Tsuji T., Weissmann J., 1976].

Однако многие исследователи справедливо указывают, что лучшие результаты разделения изоферментных спектров не только системы АК, но и многих других генетически детерминированных систем получают при электрофорезе на ПААГ-блоках, из которых удалены различные регуляторы и катализаторы полимеризации гелей, прежде всего ТЭМЭД, цианогум-41 и персульфат аммония, являющиеся ингибиторами активности многих эритроцитарных ферментов, в том числе и АК. Но, по нашему мнению, методики предварительного вымывания избытка регуляторов и катализаторов полимеризации ПААГ, предложенные Н. Норре и соавт. (1972), не решают проблемы использования этой среды для выявления большинства эритроцитарных изоферментов. Эти методы чрезвычайно трудоемки, требуют большого количества гелевого буфера, меняющегося не менее 5 раз в течение одной недели, продолжительны по времени (на подготовку одного гелевого блока затрачивается, как минимум, неделя). Кроме того, длительное пребывание ПААГ в буферных растворах приводит к разбуханию блоков, снижению разделительных свойств. Наиболее эффективными являются такие механизмы полимеризации ПААГ, в которых вообще не участвуют ингибирующие активность многих эритроцитарных ферментов катализаторы и регуляторы полимеризации гелей (ТЭМЭД, цианогум-41 и персульфат аммония). Опыты показали, что ПААГ, полученные по методу G. Pals и J. Pronk (1979), не нуждаются в предварительной длительной обработке, предшествующей использованию их для выявления групповых изоферментных спектров, поскольку входящие в состав таких гелей реагенты не являются ингибиторами ряда ферментов. Для приготовления гелей на 100 мл соответствующей смеси акриламида, N′, N′-метиленбисакриламида и буферных электролитов требуется 0,13 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 19 мг аскорбиновой кислоты и 0,12 мл 3% перекиси водорода. Качество разделения групповых изоферментов многих эритроцитарных ферментов, а так же и изоферментов АК, в таких гелях не уступает разделению в гелях, полученных при помощи ингибирующих ферментативную активность регуляторов и катализаторов полимеризации ПААГ.

Глава 20

СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Фосфоглюконатдегидрогеназа (ФГД) (КФ 1.1.1.44) катализирует реакцию декарбоксилирования 6-фосфоглюконата (6-ФГ) в рибулозо-5-фосфат. R. Fildes и C. Parr (1963) с помощью электрофореза в крахмальном геле впервые выявили генетически детерминированные варианты эритроцитарной 6-ФГД у человека. При исследовании гемолизатов эритроцитов крови 150 не связанных родством англичан авторы установили, что в крови большинства обследованных лиц (140) находился один эритроцитарный изофермент ФГД, в то время как у 10 других наблюдались тройные изоферменты, отличавшиеся в некоторых образцах по интенсивности. Посемейные обследования свидетельствовали об аутосомальном кодоминантном порядке наследования этих вариантов.

N. Carter и соавт. (1968) на обширном материале, включавшем результаты обследования 4558 жителей Лондона, показали, что обычный фенотип ФГД (Usual phenotype, или фенотип А), характеризующийся одним изоферментом, наблюдается приблизительно в 95% случаев. Приблизительно в 4% случаев простой вариант ФГД (Common variant, или фенотип АВ) характеризовался тремя изоферментами, обозначенными как с, b и а по возрастающей скорости миграции к аноду, причем интенсивность их уменьшалась от изофермента а к изоферменту с. Приблизительно у 1% обследованных лиц наблюдался несколько иной электрофоретический вариант с теми же тремя изоферментами а, b, с, однако их выраженность уменьшалась в противоположном порядке — от изофермента с к изоферменту а. Этот вариант ФГД по фамилии человека, у которого он был впервые обнаружен, назвали Canning variant, или фенотипом В. Авторы создали формально-генетическую модель наследования групп эритроцитарной ФГД, согласно которой в едином аутосомальном генном локусе системы ФГД действуют два кодоминантных аллельных гена *ФГД*^{a} и *ФГД*^{b}, обусловливающих появление генотипических фенотипов двух гомозиготных ФГД-А и ФГД-В (генотипы *ФГД*^{a}/*ФГД*^{a} и *ФГД*^{b}/*ФГД*^{b}) и одного гетерозиготного ФГД-АВ (генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{b}). Значительное преобладание частоты встречаемости фенотипа ФГД-А над фенотипом ФГД-АВ и тем более над феноти-

пом ФГД-В свидетельствовало также и о том, что в генном локусе системы ФГД частота встречаемости аллеля ФГД^{a} выше частоты встречаемости аллеля *ФГД*^{b}.

Кроме трех основных фенотипов системы 6-ФГД, обнаружены и довольно редкие атипичные электрофоретические варианты, наследственная передача которых доказана в семейных обследованиях. В настоящее время известны по крайней мере 12 атипичных вариантов ФГД, которые в основном генотипически гетерозиготны по одному из атипичных аллелей этой системы и по одному из основных аллелей *ФГД*^{a} (значительно чаще) или *ФГД*^{b} (значительно реже). Это фенотипы ФГД-AR [генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{R} (Richmond)] и ФГД-AH [генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{H} (Hackney)], ФГД-AF [генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{F} (Friendship)], ФГД-AF^{1} [генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{F1} (Freiburg)], ФГД-AE [генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{E} (Elcho)], ФГД-AN [генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{N} (Neath)]. Помимо указанных шести гетерозиготных атипичных фенотипов эритроцитарной ФГД, появление которых обусловлено действием шести редких аллелей в генном локусе этой системы, N. Blake и соавт. (1974) описали еще несколько необычных электрофоретических вариантов фермента, генетическая обусловленность которых также подтверждена.

Учитывая отличительный изоферментный спектр этих фенотипов ФГД не только от трех основных, но и от шести других ранее описанных атипичных фенотипов, предполагают, что в генном локусе системы ФГД существуют еще шесть редких атипичных аллелей. Два из них *ФГД*^{W} (Wantoat) и *ФГД*^{Can} (Canberra) обусловливают появление медленно мигрирующих атипичных изоферментов ФГД, а четыре других аллеля *ФГД*^{K} (Kadar), *ФГД*^{Cas} (Caspian), *ФГД*^{Bom} (Bombey) и *ФГД*^{Nat} (Natal) — необычных изоферментов, электрофоретическая подвижность которых превышает скорость миграции основного изофермента а в генотипически гомозиготном фенотипе ФГД-А. Атипичные фенотипы фермента, появление которых обусловлено действием названных выше аллелей, также в основном генотипически гетерозиготные по атипичному и основному аллелю *ФГД*^{a}. В двух случаях Blake и соавт. наблюдали генотипически гетерозиготные фенотипы ФГД по атипичному аллелю этой системы и основному аллелю *ФГД*^{b}. Более того, в одном случае был выявлен гомозиготный фенотип ФГД-К (Kadar) (генотип *ФГД*^{K}/*ФГД*^{K}).

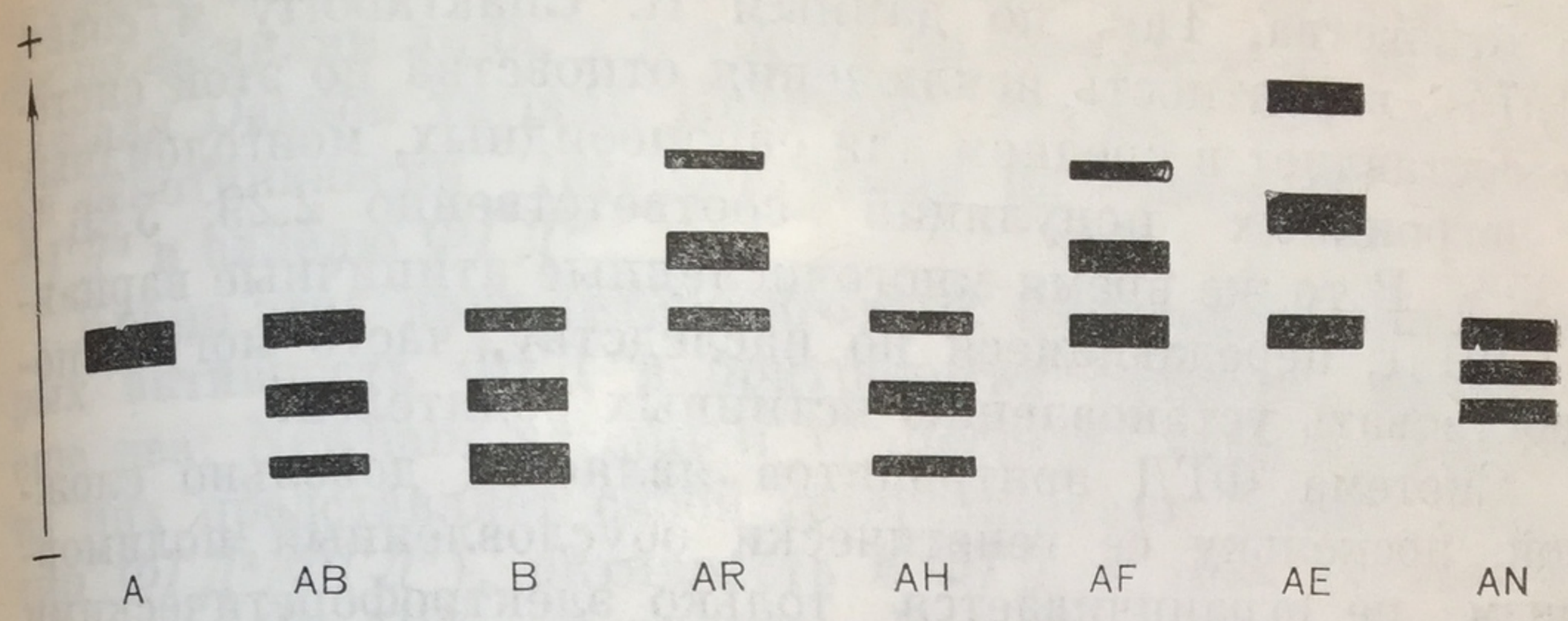


Рис. 17. Схематическое изображение трех основных (A, AB, B) и пяти атипичных фенотипов (AR, AH, AF, AE, AN) 6-фосфоглюконатдегидрогеназы.

На рис. 17 изображены групповые изоферментные спектры трех основных и пяти атипичных фенотипов системы ФГД, выявляемых с помощью электрофореза. Наиболее распространенным методом обнаружения групповых изоферментов ФГД является электрофорез в крахмальном геле, предложенный R. Fildes и C. Parr (1963).

Для электрофореза применяют непрерывную цитратную буферную систему с pH 6,0. Переходным (электродным) буфером служит цитратный буфер с 0,1 М электролита, гелевый буфер содержит лишь 0,002 М цитратного электролита. Электрофорез проводят 5—6 ч при +4—6 °С и напряжении 7,5—8,5 В/см. Для выявления активности ФГД применяют агаровую аппликацию. Инкубационная смесь: к 20 мл трис-буферу с pH 8,0 (на 1 л дистиллированной воды 12,1 триса, 3,7 г ЭДТА, 26,8 мл 2 N HCl и 10 мл М раствора $MgCl_2$) добавляют 100 мг растворимого агара. Смесь подогревают на водяной бане до полного растворения агара. После охлаждения раствора до 40 °С в него добавляют 20 мг 6-ФГ, 4 мг НАДФ, 4 мг МТТ и 1мг ФМС. После растворения реагентов смесь выливают на поверхность крахмального геля и инкубируют при 37 °С в течение 20—30 мин до появления фиолетовых зон формазана. Выявление активности 6-ФГД основано на следующем. 6-ФДГ переводит 6-ФГ в рибулозо-5-фосфат с восстановлением НАДФ и $НАДФН_2$ в присутствия МТТ и ФМС обусловливает цветовую химическую реакцию, при которой нерастворимые фиолетовые гранулы формазана выпадают в осадок в местах проявления ферментативной активности (методика приведена ниже).

Частота встречаемости аллелей *ФГД*^{a} и *ФГД*^{b} среди различных популяций составляет в среднем соответственно 95 и 5%. Значительное преобладание частоты встречаемости аллеля *ФГД*^{a} над частотой встречаемости аллеля ФГД^b делает систему 6-ФДГ относительно мало информативной в судебно-медицинских экспертизах спорно-

го отцовства. Так, по данным R. Chakraborty и соавт. (1974), вероятность исключения отцовства по этой системе составляет в среднем для европеоидных, монголоидных и негроидных популяций соответственно 2,29; 5,86 и 3,35%. В то же время многочисленные атипичные варианты ФГД, передающиеся по наследству, часто могут способствовать установлению истинных родителей.

Система ФГД эритроцитов является довольно сложной, поскольку ее генетически обусловленный полиморфизм не ограничивается только электрофоретическими вариантами, а проявляется и в различной ферментативной активности. У некоторых людей обнаружили частичный дефицит активности 6-ФДГ, который передается по наследству, что свидетельствует о генетической обусловленности такого дефицита. Тот факт, что наследственные варианты ФГД, связанные с частичным дефицитом активности фермента, выявлены только у лиц, имевших якобы генотипически гомозиготные электрофоретические фенотипы ФГД-А и ФГД-В, и ни в одном случае не обнаружены у лиц с гетерозиготным фенотипом ФГД-АВ, свидетельствует о гетерозиготности не только по основному аллелю *ФГД*^{a} или *ФГД*^{b}, но и какому-то другому аллелю, обусловливающему снижение ферментативной активности ФГД.

N. Carter и соавт. (1968) описали два вида такого уменьшения ферментативной активности у лиц с фенотипом ФГД-А. В одних случаях наблюдалась активность ФГД, составляющая 50—60% нормальной активности, в других случаях — 75—80%. Авторы предположили, что в данных случаях существовала наследственная передача двух разных атипичных аллелей, каждый из которых в различной степени обусловливает снижение ферментативной активности. В дальнейшем это предположение было подтверждено семейными обследованиями, в которых наблюдалась наследственная передача строго определенного в количественном отношении снижения активности ФГД.

По фамилии лица, у которого впервые был выявлен генетически детерминированный дефицит активности ФГД, составляющий 50—60% от нормы, фенотип обозначили Ilford variant. Считают, что гепотипически он характеризуется гетерозиготной формой по аллелю *ФГД*^{a} и атипичному аллелю *ФГД*^{0}, обусловливающему 40—50% снижение активности ФГД в эритроцитах крови человека. Другой фенотип ФГД, при котором активность фермента

снижена лишь на 20—25% по сравнению с нормой, также по фамилии лица, у которого он был впервые выявлен, назвали Dalston variant. Полагают, что этот фенотип также генотипически гетерозиготный по основному аллелю *ФГД*^{a} и аллелю *ФГД*^{w}.

Кроме этих двух гетерозиготных фенотипов, при которых активность ФГД в эритроцитах снижена, найдены еще два: Newham variant и Whitechepel variant. Первый из них представляет собой гетерозиготную форму (генотип *ФГД*^{a}/*ФГД*^{0}), активность 6-ФГД в этом случае составляет 40—50% от нормы. Второй вариант является генотипически гомозиготным фенотипом ФГД-W (генотип *ФГД*^{w}/*ФГД*^{w}), активность фермента при этом варианте составляет всего 1—5% от нормы.

Наличие в генном локусе системы ФГД «скрытых», или «немых», аллелей *ФГД*^{0} и *ФГД*^{w}, снижающих в комбинации с обычными аллелями *ФГД*^{a} или *ФГД*^{b} активность фермента, всегда нужно учитывать при судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей. Особое внимание следует обращать на исключение возможности отцовства (материнства) по противоположной гомозиготности (например, ответчик или мать ребенка имеет фенотип ФГД-А, а ребенок — фенотип ФГД-В и наоборот). Во всех таких случаях во избежание ошибочной трактовки противоположной гомозиготности, маскирующей истинную гетерозиготность (*ФГД*^{a}/*ФГД*^{0} или *ФГД*^{a}/*ФГД*^{w} и *ФГД*^{b}/*ФГД*^{0} или *ФГД*^{b}/*ФГД*^{w}), эксперт должен в первую очередь учитывать интенсивность окрашивания групповых изоферментов ФГД у всех проходящих по делу лиц. При снижении такой выраженности изоферментов у ребенка и «исключившихся» ответчика или матери ребенка всегда следует думать о возможности наследственной передачи ребенку одного из аллелей *ФГД*^{0} или *ФГД*^{w}, обусловливающих снижение активности эритроцитарной ФГД. Для выяснения этого судебно-медицинский эксперт должен провести расширенное исследование групп ФГД у ближайших родственников проходящих по делу лиц, а также точный количественный анализ активности фермента в эритроцитах крови.

Активность ФГД определяют с помощью следующего метода. Гемолизаты эритроцитов (1 : 50) готовят путем смешивания 0,1 мл цельной крови с 4,9 мл дистиллированной воды. Через 1 мин смесь центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин и прозрачный гемолизат сразу же фотоколориметрируют. Половину гемолизата

помещают в кювету, к нему добавляют 1 мл 0,3 М трис-буфера pH 8,0, 0,3 мл 0,1 М $MgCl_2$, 0,1 мл 18 мкМ натриевой соли 6-ФГ и 1,4 мл дистиллированной воды. Вторую порцию гемолизата помещают в другую кювету, к нему для выявления суммарной активности ФГД и Г6ФД добавляют те же реагенты и 0,1 мл 18 мкМ раствора натриевой соли Г6Ф. Реакция начинается после добавления в обе кюветы по 0,1 мл 6 мкМ раствора НАДФ. Оптическую плотность (Е) определяют с интервалом в 1 мин в течение 10 мин при длине волны λ 340 нм. Контроль — оптическая плотность раствора, содержащего 0,5 мл гемолизата, 1 мл 0,3 М трис-буфера pH 8,0 и 1,5 мл дистиллированной воды. Концентрацию гемоглобина определяют при λ=540 нм по отношению к оптической плотности дистиллированной воды. Активность эритроцитарной ФГД выражают в международных единицах (МЕ) по формуле

$$\text{ФГД МЕ на 1 г Hb} = \frac{137{,}9(\Delta E) \text{ при } \lambda = 340 \text{ нм}}{\Delta E \text{ при } \lambda = 540 \text{ нм}}.$$

В настоящее время считается доказанным, что генный локус системы ФГД, так же как и генный локус системы ФГМ[1], может располагаться либо на коротком плече, либо на проксимальной части длинного плеча хромосомы N1.

Глава 21
СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ

Аденозиндезаминаза (АДА) катализирует реакцию дезаминирования аденозина, при которой аденозин превращается в инозин. Активность АДА проявляется в большинстве тканей человеческого организма и эритроцитах.

N. Spencer и соавт. (1968) с помощью электрофореза в крахмальном геле с последующим выявлением активности АДА впервые выявили три вида изоферментных спектров АДА в гемолизатах эритроцитов крови различных людей. Авторы предположили, что наблюдаемый ими изоферментный полиморфизм является генетически обусловленным.

Для электрофореза N. Spencer и соавт. использовали две непрерывные буферные системы, в которых изоферменты разделялись приблизительно одинаково: фосфатную с pH 6,5 (0,01 М фосфатный гелевый буфер и 0,1 М фосфатный электродный буфер) и цитратную с pH 5,9 (0,005 М цитратный гелевый буфер и 0,1 М цитратный электродный буфер). Использовали 12% крахмальный гель, электрофорез проводили 16—17 ч при 4 °С и напряжении 3—3,5 В/см. G. Radam и H. Strauch (1971) для выявления изоферментного спектра АДА рекомендуют несколько другие условия электрофореза: электродный буфер — 0,1 М KH_2PO_4, pH 6,5; гелевый буфер — 0,001 М KH_2PO_4, pH 6,5. Электрофорез проводят 4 ч при 4 °С и напряжении 10 В/см.

Принцип выявления энзиматической активности АДА основан на следующем. В результате воздействия АДА на аденозин, являющийся для нее субстратом, последний дезаминируется и переходит в инозин, который в присутствии нуклеозидфосфорилазы и арсената (или фосфата) переходит в гипоксантин. Гипоксантин в свою очередь в присутствии ксантиноксидазы окисляется. Окисленный гипоксантин под действием МТТ и ФМС дает цветовую химическую реакцию, в результате которой в осадок выпадают нерастворимые соли формазана фиолетового цвета.

Ферментативную активность АДА чаще всего выявляют с помощью агаровой аппликации. На водяной бане предварительно растворяют 100 мг агара в 100 мл 0,025 М фосфатного буфера pH 7,5 или в 100 мл 0,06 М или 0,1 М трис-буфера pH 8. После охлаждения раствора до 40—45 °С в него добавляют 40 мг аденозина, 10 мг МТТ и ФМС, 40 мкл суспензии ксантиноксидазы (0,16 МЕ), 40 мкл суспензии нуклеозидфосфорилазы (1,6 МЕ) и 150 мг арсената натрия. После растворения реагентов смесь выливают на поверхность крахмального геля и инкубируют $1^1/_2$—2 ч при 37 °С до появления фиолетовых зон формазана в местах активности АДА.

Для выявления изоферментов эритроцитарной АДА предлагают использовать и другие разделительные методы: электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках или мембранах, горизонтальный электрофорез в ПААГ, горизонтальный высоковольтный электрофорез в тонком слое крахмального геля.

В результате семейных обследований и обследований многочисленных пар мать — ребенок A. Spencer и соавт. (1968) смогли убедиться в правильности созданной ими формально-генетической модели наследования групп эритроцитарной АДА. Согласно этой гипотезе, в соответствующем генном локусе на аутосомальной хромосоме действует пара аллельных генов, обозначенных аллелями *АДА*[1] и *АДА*[2], которые, являясь по отношению друг к другу кодоминантными, обусловливают появление трех фенотипов этой ферментной системы: двух генотипически гомозиготных по соответствующим аллелям (АДА-1 и АДА-2) и одного генотипически гетерозиготного (АДА-2-1). Семейные обследования, а также исследования не связанных родством лиц, проведенные за последние годы во многих странах, свидетельствуют о значительном превалировании частоты встречаемости аллеля *АДА*[1] (90—95%) над частотой встречаемости аллеля

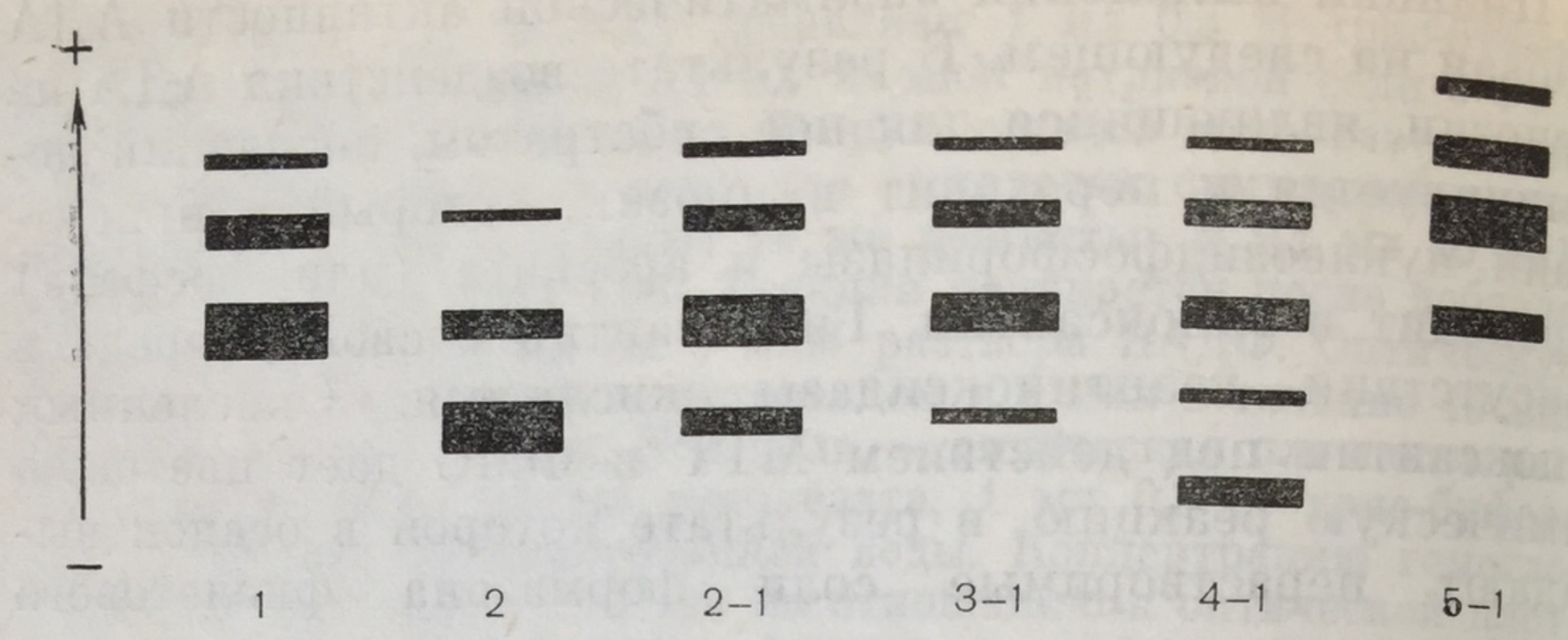


Рис. 18. Схематическое изображение трех основных (1, 2, 2-1) и трех атипичных фенотипов (3-1, 4-1. 5-1) аденозиндеаминазы.

АДА[2] (5—10%), вследствие чего значительно чаще встречается гомозиготный фенотип АДА-1, реже — гетерозиготный фенотип АДА-2-1 и еще реже — гомозиготный фенотип АДА-2.

Уже на следующий год после открытия генетически обусловленного полиморфизма эритроцитарной АДА в генном локусе этой системы были обнаружены и другие, по-видимому, редкие аллели *АДА*[3] и *АДА*[5]. Во всех случаях необычные фенотипы, обусловленные действием этих атипичных аллелей *АДА*[3], *АДА*[4] и *АДА*[5], генотипически характеризовались гетерозиготной формой по аллелю *АДА*[3], *АДА*[4] или *АДА*[5] и наиболее распространенному аллелю *АДА*[1], т. е. соответственно фенотипы АДА-3-1, АДА-4-1 и АДА-5-1. Фенотип АДА-3-1 очень похож на обычный гетерозиготный фенотип АДА-2-1: он характеризуется четырьмя изоферментами, обладающими такой же электрофоретической подвижностью, как и четыре изоформы при фенотипе АДА-2-1. Однако в отличие от фенотипа АДА-2-1 два медленно мигрирующих к аноду изофермента при фенотипе АДА-3-1 выражены значительно слабее. Гетерозиготный фенотип АДА-4-1 отличается от всех других известных фенотипов этой системы, поскольку его изоферментный спектр характеризуется 4 изоферментами, присущими фенотипу АДА-3-1, и еще одним пятым изоферментом, наиболее медленно мигрирующим к аноду. Гетерозиготный фенотип АДА-5-1 характеризуется четырьмя групповыми изоферментами, скорость миграции которых к аноду превышает таковую во всех известных ранее фенотипах этой системы. На рис. 18 изображены группо-

вые изоферментные спектры трех основных и трех атипичных фенотипов системы АДА.

В дальнейшем G. Radam и соавт. [цит. по Prokop D. и Göhler W., 1976] выявили еще один атипичный аллель, названный ими аллелем *АДА*^{6}. Интересно, что все до сих пор описанные атипичные аллели (*АДА*^{3} — *АДА*^{6}) встречались в гетерозиготной форме с аллелем *АДА*^{1}, за исключением одного случая обнаружения фенотипа АДА-5-2, генотипа *АДА*^{5}/*АДА*^{2}. Судебно-медицинским экспертам, использующим генетически обусловленный полиморфизм ферментной системы АДА, необходимо учитывать и возможность наследственной передачи «немого» аллеля *АДА*^{0}, существование которого в генном локусе этой системы доказано в многочисленных семейных обследованиях.

Необходимо отметить, что почти для всех генетически детерминированых систем крови человека (точнее для генных локусов, контролирующих полиморфизм этих систем), используемых для экспертного решения вопроса о возможности или невозможности рождения того или иного ребенка от определенной родительской пары, доказано существование, а следовательно, и возможность наследственной передачи «немых», или «скрытых», аллелей. Большинство таких аллелей, по-видимому, встречается чрезвычайно редко. Однако, поскольку целенаправленных исследований, посвященных изучению частоты их встречаемости в той или иной системе крови человека, не проводилось, не исключено, что в некоторых системах частота «немых» аллелей не такая уж низкая. Поэтому неучитывание возможности наследственной передачи таких аллелей, особенно (что чаще всего и бывает) при гетерозиготной форме с обычным структуральным геном, таит в себе большую опасность ошибочного трактования мнимой гомозиготности вместо истинной гетерозиготности по структуральному и «немому» аллелю. Все это в полной мере относится и к системе эритроцитарной АДА.

Во всех случаях противоположной гомозиготности ребенка и одного из его предполагаемых родителей, исключающей возможность рождения ребенка от данной родительской пары, судебно-медицинский эксперт, использующий в своих исследованиях генетически детерминированный полиморфизм системы АДА, обязан в первую очередь обращать внимание на выраженность ее групповых

изоферментов в гемолизатах эритроцитов ребенка и «исключенного» родителя. Снижение выраженности изоформ АДА при противоположно гомозиготных фенотипах АДА-1 и АДА-2 по сравнению с таковой в контрольных образцах или с выраженностью при гетерозиготном фенотипе АДА-2-1 свидетельствует, очевидно, о наследственной передаче от данного родителя ребенку «немого» не структурального аллеля $АДА^0$, который обусловливает дефицит ферментативной активности. Для доказательства такой наследственной передачи атипичного «немого» аллеля эксперт обязан также провести, если это возможно, расширенное исследование изоферментов АДА у ближайших родственников предполагаемого родителя. Кроме того, в таких случаях желательно провести и количественный фотоколориметрический учет ферментативной активности в гемолизатах эритроцитов ребенка и его предполагаемого родителя. Доказательство генотипической гетерозиготности фенотипов АДА по аллелю $АДА^0$ и соответствующим структуральным аллелям $АДА^1$ и $АДА^2$ служит веским основанием для утверждения того, что данное лицо является действительным родителем ребенка.

Преобладание частоты встречаемости аллеля $АДА^1$ над таковой аллеля $АДА^2$, которое наблюдается во всех основных расах людей, снижает полиморфность этой системы. Это отражается и на процентной вероятности исключения отцовства по данной системе. Например, средняя вероятность исключения отцовства по системе АДА среди европеоидных, негроидных и монголоидных популяций, по данным D. Hopkinson и соавт. (1968), составляет соответственно 4,82; 2,83 и 2,91%. По данным O. Prokop и W. Göhler (1976), эта величина для населения Европы несколько выше и колеблется в пределах 5—7%.

Многие судебно-медицинские эксперты считают, что редкие атипичные фенотипы этой системы, обусловленные действием атипичных аллелей $АДА^3$, $АДА^4$, $АДА^5$, $АДА^6$ и $АДА^0$ и выявляемые у ребенка и его предполагаемого отца, можно использовать для подтверждения отцовства. Однако во всех таких случаях целесообразно провести параллельное электрофоретическое исследование в гелях крахмала и полиакриламида, поскольку эти методы, обладая максимальной разделительной способностью, позволят подтвердить наличие у ребенка и его предполагаемого отца необычных групповых изоферментов.

Глава 22

СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ГЛУТАМАТ-ПИРУВАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

Глутамат-пируват-аминотрансфераза (ГПАТ) выполняет в организме важную функцию в обмене углеводов и метаболизме аминокислот — катализирует обратимую реакцию переноса аминной группы.

ГПАТ является одним из ферментов, существующих в двух структурах клетки — цитоплазме (растворимая форма) и митохондриях (нерастворимая форма). В зрелых эритроцитах крови человека имеется только цитоплазматическая растворимая форма этого фермента.

Впервые генетически детерминированный полиморфизм эритроцитарной ГПАТ описали S. Chen и E. Giblett (1971). С помощью вертикального электрофореза гемолизатов эритроцитов в крахмальном геле авторы установили, что в эритроцитах крови различных людей можно выявить три различных изоферментных спектра. Семейные обследования, а также обследования пар мать — ребенок, проведенные авторами, отчетливо свидетельствовали о простом аутосомальном кодоминантном порядке наследования вариантов фермента, согласующемся с формально-генетической гипотезой контролирования полиморфизма двумя аллельными генами ГПАТ[1] и ГПАТ[2] в соответствующем генном локусе без доминирования. Согласно этому полиморфизм системы ГПАТ проявляется тремя фенотипами: двумя гомозиготными — ГПАТ-1 и ГПАТ-2 и одним гетерозиготным — ГПАТ-2-1.

Для выявления групповых изоферментов ГПАТ используют в основном метод вертикального или горизонтального электрофореза в крахмальном геле, предложенный E. Giblett (1971), S. Chen и соавт. (1972).

Для электрофореза используют непрерывную трис-цитратную буферную систему pH 7,5. Электродный буфер: 0,1 М триса и 0,028 М лимонной кислоты. Гелевый буфер: электродный, разведенный дистиллированной водой 1 : 10. Электрофорез проводят 17—18 ч при +4—6 °С и напряжении 10—12 В/см.

Существуют два метода выявления групповых изоферментов ГПТ — «ультрафиолетовый» по S. Chen и E. Giblett (1971) и формазановый по J. Kömpf (1972).

«Ультрафиолетовый» метод. В 100 мл 0,1 М трис-HCl-буфера pH 8 содержится 0,2 М DL-аланина, 0,0087 М α-кетоглютаровой кислоты, 0,001 М восстановленного НАДН$_2$ и 8 МЕ активности ЛДГ на 1 мл раствора. Крахмальный гель инкубируют в этой реакционной смеси в течение 3 ч при 37 °С. После инкубации гель

промывают в дистиллированной воде и подвергают ультрафиолетовому облучению в темной комнате. При этом изоферментные зоны электрофоретически разделенной ГПАТ проявляются в виде нефлюоресцирующих участков на равномерном голубом флюоресцирующем фоне остальной поверхности крахмального геля. Принцип выявления изоферментов ГПАТ состоит в следующем. Поскольку ГПАТ катализирует обратимую реакцию перехода L-аланина и α-кетоглутарата в пируват и L-глутамат, то в присутствии ЛДГ образовавшийся пируват переходит в L-лактат. Последний в свою очередь, окисляет флюоресцирующую в ультрафиолетовых лучах восстановленную форму $НАДН_2$ в окисленную форму НАД, которая не флюоресцирует.

Этот метод не лишен недостатков, сводящихся в основном к трудностям регистрации результатов исследования (фотографирование в темном помещении нефлюоресцирующих изоферментов и нестойкость нефлюоресцирующих зон).

Формазановый метод позволяет легко фотографировать изоферментные спектры, которые достаточно стабильны и четки.

Формазановый метод. Инкубационная смесь содержит 360 МЕ активности ЛДГ и 50 мл 0,2 М трис-цитратного буфера, в котором растворено 0,4 г L-аланина, 0,05 г α-кетоглутаровой кислоты, 0,03 г НАДФ, 0,003 г ФМС, 0,004 МТТ, 0,002 г пиридоксаль-5-фосфата. Крахмальный гель инкубируют в этой реакционной смеси 2—3 ч при 37 °С до появления четких фиолетовых формазановых зон в местах проявления изоферментной активности. Некоторые авторы предлагают, кроме формазанового метода, использовать аппликацию в агаре.

Принцип цветовой формазановой реакции выявления ферментативной активности ГПТ следующий. Образующийся в процессе переноса аминогрупп пируват в присутствии ЛДГ переходит в L-лактат, который в присутствии пиридоксаль-5-фосфата восстанавливает окисленную форму НАДФ в восстановленную форму $НАДФН_2$. Восстановленный $НАДФН_2$ в присутствии ФМС и МТТ дает цветовую реакцию, в результате в осадок выпадают нерастворимые фиолетовые гранулы формазана.

Активность цитоплазматической ГПАТ в гемолизатах эритроцитов крови человека определяют колориметрическим методом. Принцип определения активности ГПАТ заключается в следующем. В результате реакции, которую катализирует ГПАТ, образуется пируват. Последний в реакции с динитрофенилгидразином образует гидразон. Гидразон экстрагируют из гемолизатов толуолом и к вытяжке для наступления цветовой реакции добавляют концентрированную щелочь. Интенсивность появившегося в результате такой обработки коричневого окрашивания экстракта пропорциональна количеству пирувата, образовавшегося в результате реакции трансаминирования, а следовательно, и активности эритроцитарной ГПАТ.

Для исследования необходимы следующие реагенты. 1. Трис-HCl-буфер: 0,1 М раствор триса, доведенный до pH 7,8 HCl. 2. Раствор субстрата: 100 мМ L-аланина и 35 мМ α-кетоглутарата (натриевая соль) растворяют в трис-HCl-буфере и доводят до pH 7,8 0,2 М NaOH. 3. Красящий реагент: 0,1% 2,4-динитрофенилгидразин в 20% HCl. 4. Щелочной раствор: 2,5% KOH в 95% этаноле. 5. Кислотный раствор: 100% трихлоруксусная кислота.

Две пробирки (опытная и контрольная) подогревают на водяной бане до 37 °С, в опытную пробирку добавляют 0,5 мл субстрата и через 10 мин в обе пробирки — по 0,5 мл гемолизата. Добавляют каплю кислотного раствора в контрольную пробирку сразу же, а в исследуемую через 30 мин инкубации. Обе пробирки оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем в них добавляют по 2 мл толуола. Пробирки резко встряхивают и центрифугируют 1 мин. Из каждой пробирки берут по 1 мл толуолового экстракта и помещают в соответствующую кювету колориметра. В каждую кювету добавляют 3 мл щелочного раствора, перемешивают; оптическую плотность (Е) определяют при $\lambda=490$ нм. Стандартную кривую строят по данным измерения Е нескольких растворов 1 мМ пирувата при $\lambda=10—500$ нм. За единицу активности ГПАТ принимают такое количество фермента, которое образует 1 мкМ пирувата. Активность фермента в гемолизатах эритроцитов выражают в соответствующих единицах на 1 г Hb (по цианметгемоглобиновому методу).

Обширный популяционно-генетический материал, накопленный при изучении полиморфизма эритроцитарной ГПАТ, свидетельствует о довольно благоприятной для судебно-медицинской экспертизы частоте встречаемости основных аллелей *ГПАТ*[1] и *ГПАТ*[2].

Почти одинаковая частота встречаемости этих аллелей среди европеоидных популяций обусловливает самый высокий для двухаллельной генетически детерминированной системы процент вероятного исключения отцовства только по одной системе ГПАТ. Такой средний показатель для европеоидной, монголоидной и негроидной популяций, по данным S. Chen и E. Giblett (1971), составляет соответственно 18,75; 18,26 и 12,85%.

B. Olaisen (1975) отмечает довольно поздние сроки онтогенетического формирования групповых изоферментов ГПАТ у ребенка, которое наступает в конце 2-го месяца жизни. Автор рекомендует использовать полиморфизм системы ГПАТ в экспертизах спорного отцовства только в тех случаях, когда возраст ребенка достигнет 3 мес и больше. Кроме того, B. Olaisen подчеркивает, что исследование нужно проводить только со свежими гемолизатами эритроцитов, поскольку даже 3—4-дневное хранение изменяет электрофоретическую картину изоферментов; это может привести к ошибочной трактовке результатов.

Перспективность использования генетически обусловленного полиморфизма системы ГПАТ в экспертизах спорного отцовства обусловлена не только благоприятной частотой встречаемости двух основных аллелей *ГПАТ*[1] и

ГПАТ[2] среди населения Земного шара, но и наличием многих атипичных аллелей в генном локусе этой системы. Существование таких аллелей доказано обширными семейными обследованиями, обследованиями пар мать — ребенок и гомозиготных близнецов. Кроме того, атипичные аллели системы ГПАТ в отличие от множества атипичных аллелей в генных локусах других генетических систем крови человека не столько уж редки, вследствие чего вероятность обнаружения необычных фенотипов этой системы довольно высока. По мнению большинства судебных медиков, выявление атипичных фенотипов у ребенка и ответчика наряду с расширенным исследованием других генетических маркеров крови служит веским основанием для установления отцовства.

Уже в первых популяционно-генетических обследованиях, проведенных S. Chen и соавт. (1972), было выявлено несколько атипичных фенотипов, наследственная передача которых, а следовательно, и их генетическая обусловленность доказана семейными обследованиями. Большинство атипичных фенотипов ГПАТ являлись генотипически гетерозиготными по какому-либо атипичному аллелю и одному из основных аллелей. Гетерозиготные фенотипы ГПАТ-3-1 и ГПАТ-3-2 обнаружены у пяти лиц европейской расы (из 93 обследованных). Генетическим продуктом аллеля *ГПАТ*[3] были изоферменты, обладающие максимальной скоростью миграции к аноду. У 3 из 220 лиц, принадлежащих к афро-американским негроидным популяциям, наблюдался атипичный фенотип ГПАТ-4-1. Он характеризовался двумя медленно мигрирующими к аноду изоферментами ГПАТ, характерными для фенотипа ГПАТ-2-1, и одним необычным промежуточным изоферментом. Необычный фенотип ГПАТ-5-1 был выявлен у семи членов одной эскимосской канадской семьи в трех поколениях. Электрофоретически изоферментный спектр этого необычного гетерозиготного фенотипа был похож на изоферментный спектр фенотипа ГПАТ-4-1, однако все три его изофермента располагались более компактно.

Еще два новых атипичных гетерозиготных фенотипа — ГПАТ-6-1 и ГПАТ-6-2 — обнаружили у четырех не связанных родством жителей Новой Гвинеи и Филиппинских островов. Генетическим продуктом атипичного аллеля *ГПАТ*[6] являлись изоферменты, обладающие самой низкой электрофоретической миграцией к аноду. Авторы

не смогли доказать наследственную передачу аллеля *ГПАТ*[6]. Однако в дальнейшем реальность существования аллеля *ГПАТ*[6] в генном локусе системы ГПАТ и его наследственная передача были доказаны семейными обследованиями, проведенными другими исследовательскими группами.

B. Olaisen (1973) обнаружил два новых атипичных фенотипа ГПАТ — ГПАТ-7-1 и ГПАТ-7-2. Оба фенотипа наблюдались у членов одной норвежской семьи в нескольких поколениях, что доказывало реальное существование и наследственную передачу аллеля *ГПАТ*[7].

На рис. 19 представлены изоферментные спектры трех обычных фенотипов системы ГПАТ и восьми атипичных гетерозиготных фенотипов.

Таблица 20

Распределение фенотипов ГПАТ

[*по Chen S. и соавт., 1972*]

Родительские пары	Число семей	Фенотип у детей			Всего
		ГПАТ-1	ГПАТ-2-1	ГПАТ-2	
1×1	15	60	—	—	60
1×2-1	50	63	73	—	136
1×2	18	—	62	—	62
2-1×2-1	27	27	36	29	92
2-1×2	16	—	21	24	45
2×2	4	—	—	12	12
Итого . . .	130	150	192	65	407

Из табл. 20 видно, что семейные обследования включали в себе 37 так называемых «критических» родительских пар, в которых оба родителя имели одинаковые или разные генотипически гомозиготные группы ГПАТ. Если формально-генетическая модель наследования соответствует истине, то в этих семьях должны родиться дети с единственно возможными гомо- или гетерозиготными фенотипами ГПАТ, и 134 ребенка имели единственно возможный для них фенотип ГПАТ.

W. Spielmann и соавт. (1973) наблюдали в одной немецкой семье противоположную гомозиготность по системе ГПАТ у матери и сына (возможность перепутывания

ребенка в данном случае полностью исключалась). Авторы заподозрили наследственную передачу от матери к сыну «немого» неструктурального аллеля $ГПАТ^0$, поскольку интенсивность изоферментов ГПАТ-2 у матери и ГПАТ-1 у сына была ниже, чем интенсивность изоферментов в контрольных образцах. Оказалось, что в эритроцитах крови матери и сына был значительный дефицит активности ГПАТ. Это доказывало наследственную передачу аллеля $ГПАТ^0$ в гетерозиготной форме с аллелями $ГПАТ^1$ или $ГПАТ^2$, обусловливающего снижение ферментативной активности. Отец ребенка имел фенотип ГПАТ-1 с нормальной активностью, что свидетельствовало о генотипической гомозиготности $ГПАТ^1/ГПАТ^1$. Из этого следовало, что от отца сын получил аллель $ГПАТ^1$, а от матери, генотипической гетерозиготной $ГПАТ^2/ГПАТ^0$, — аллель $ГПАТ^0$, т. е. сын также был генотипически гетерозиготным $ГПАТ^1/ГПАТ^0$. Исследование типов ГПАТ у ближайших родственников матери ребенка также подтвердило наследственную передачу «немого» аллеля $ГПАТ^0$ в данной семье по материнской линии.

Этот пример очень поучителен для судебно-медицинских экспертов. Он заставляет относиться с большой осторожностью ко всем случаям исключения отцовства или материнства по противоположной гомозиготности той или иной генетически детерминированной системы. Во избежание ошибочного исключения в таких случаях необходимы расширенное исследование групп крови по «исключающей» системе ближайших родственников отца или матери ребенка, а также, если речь идет о ферментных группах крови, количественный анализ активности ферментов крови у всех проходящих по делу лиц.

A. Du Chesne и соавт. (1974) у одного жителя Лейпцига наблюдали полное отсутствие активности ГПАТ в эритроцитах крови, а также отсутствие изоферментов ГПАТ. Авторы полагают, что обнаруженный ими необычный фенотип ГПАТ-0 является генотипически гомозиготным по «немому» аллелю ($ГПАТ^0/ГПАТ^0$), поскольку у обоих родителей данного лица было выявлено резкое снижение ферментативной активности.

Для того чтобы количественно определять активность эритроцитарной ГПАТ, судебно-медицинский эксперт должен помнить о том, что генетические продукты двух основных структуральных аллелей $ГПАТ^1$ и $ГПАТ^2$ обус-

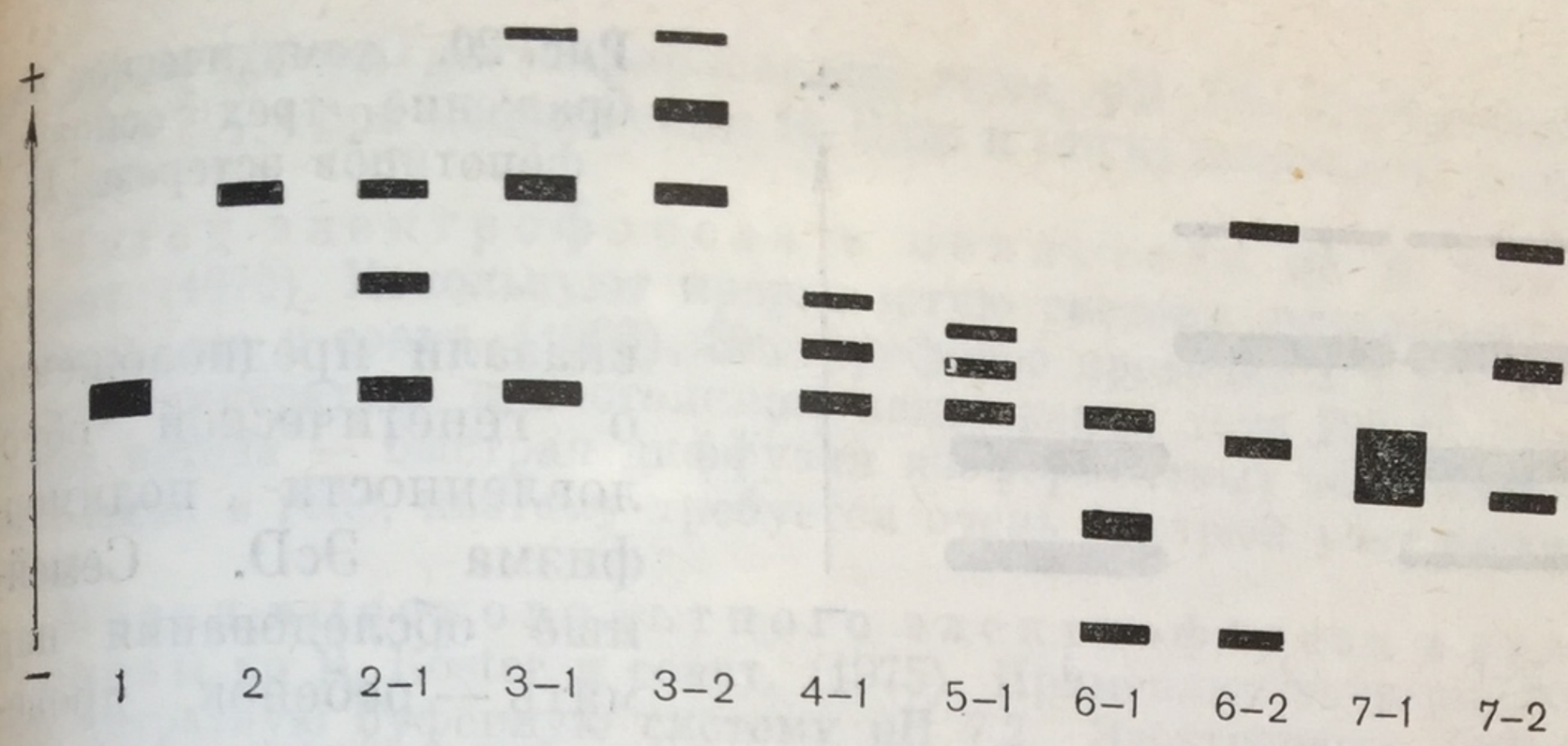


Рис. 19. Схематическое изображение трех основных (1, 2, 2-1) и восьми атипичных фенотипов глутамат-пируват-аминотрансферазы.

ловливают различную каталитическую активность фермента в эритроцитах (аллель *ГПАТ*[1] обусловливает более высокую активность). Вследствие этого при трех различных фенотипах этой системы (ГПАТ-1, ГПАТ-2-1. ГПАТ-2) наблюдается разная ферментативная активность. По данным S. Chen и соавт. (1972), она составляет: при ГПАТ-1 4,17±1,58, при ГПАТ-2-1 2,75±1,15 и при ГПАТ-2 1,67±0,68 ед/г Hb.

Глава 23
СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ЭСТЕРАЗЫ D

В эритроцитах крови человека содержится большое число карбоксигидролаз (эстераз) различных классов и подклассов, появление и активность которых контролируется структуральными генами не менее 9 различных генных локусов. Большинство из них не обладает генетически обусловленной полиморфностью, за исключением некоторых эритроцитарных карбоангидраз.

D. Hopkinson и соавт. (1973) при изучении эстеразной активности в гемолизатах эритроцитов крови человека выявили новую, специфичную только для данных субстратов эстеразу, ее назвали эстеразой D (ЭсD). Оптимум pH фермента 5,0—5,5, молекулярная масса около 60 000 дальтон. Используя метод электрофореза в крахмальном геле с последующим выявлением ферментативной активности ЭсD, D. Hopkinson и соавт. (1973) обнаружили три разных изоферментных спектра ЭсD и вы-

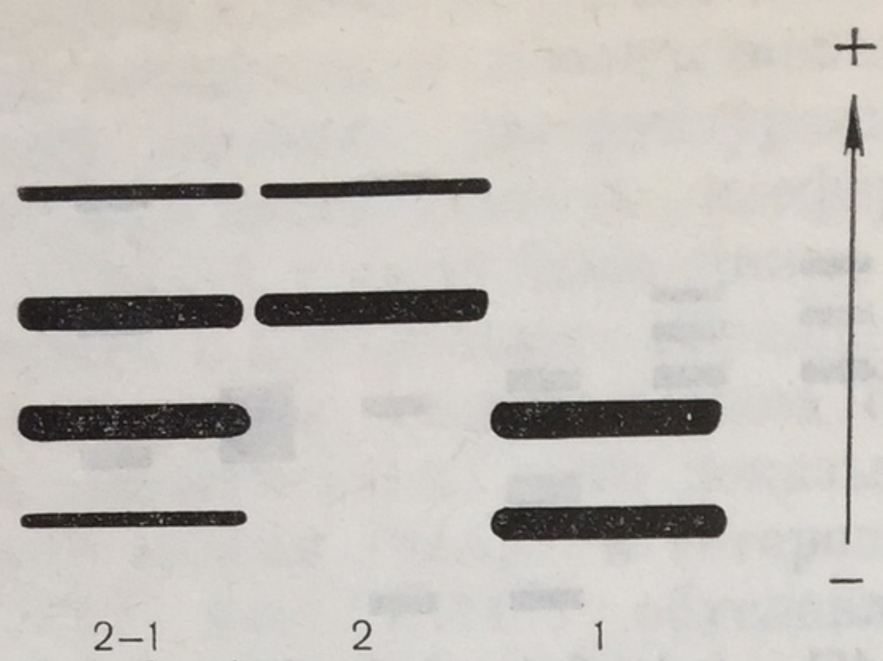


Рис. 20. Схематическое изображение трех основных фенотипов эстеразы D.

сказали предположение о генетической обусловленности полиморфизма ЭсD. Семейные обследования пар мать — ребенок, проведенные этими исследователями, свидетельствовали о простом кодоминантном аутосомальном порядке наследования трех групп фермента. Их полиморфизм обусловлен действием в соответствующем генном локусе этой системы пары аллельных генов, обозначенных аллелями *ЭсD*[1] и *ЭсD*[2]. Эти аллели ответственны за появление трех групп эритроцитарной ЭсD: двух генотипически гомозиготных по соответствующему аллелю (*ЭсD*-1 и *ЭсD*-2) и одной генотипически гетерозиготной по этим аллелям (ЭсD-2-1). Электрофоретически изоферментный спектр фенотипа ЭсD-1 характеризуется двумя интенсивными зонами, медленно мигрирующими к аноду, фенотип ЭсD-2 — также двумя зонами, но менее интенсивными, быстро мигрирующими к аноду, фенотип ЭсD-2-1 — четырьмя изоферментами, скорость миграции которых совпадает с электрофоретической подвижностью четырех изоферментов, наблюдаемых в гомозиготных фенотипах ЭсD-1 и ЭсD-2 (рис. 20).

Для электрофоретического разделения групповых изоферментов эритроцитарной ЭсD предложены различные методы электрофореза в гелях крахмала, агарозы, на ацетатцеллюлозных мембранах и в целлогеле.

Метод электрофореза в крахмальном геле по D. Hopkinson и соавт. (1963). Используют прерывистую трис-цитратно-боратно-гидроксидлитиевую буферную систему pH 6,8. Гелевый буфер: 0,1 М раствор триса, доведенный до pH 6,8 лимонной кислотой. Электродный буфер: раствор 0,2 М H_3BO_3 и 0,02 М гидроксида лития, pH 6,8. Электрофорез проводят 16—17 ч при 4—6 °С при напряжении 5—6 В/см.

Метод электрофореза в крахмальном геле по Stöhlmacher R. и Haferland W. (1964). Применяют непрерывную фосфатную буферную систему pH 7,4. Основной буферный раствор: 500 мл 0,1 М K_2HPO_4 + 150 мл 0,1 М KH_2PO_4, pH 7,4. Электродный буфер: 200 мл основного буферного раствора + 600 мл дистиллированной воды, pH 7,4. Гелевый буфер: 3 мл основного буферного

раствора + 247 мл дистиллированной воды, pH 7,4. Электрофорез проводят $7^1/_2$ ч при напряжении 14 В/см и циркуляционном охлаждении.

Метод электрофореза в целлогеле по A. Struijk и соавт. (1976). Используют прерывистую систему, предложенную D. Hopkinson и соавт. (1963). Электрофорез проводят 2 ч при комнатной температуре и постоянном напряжении тока 200 В. Недостаток метода — быстрая диффузия изоферментных зон после их выявления в геле, поэтому требуется очень быстрый учет результатов.

Метод высоковольтного электрофореза в геле агарозы по B. Köster и соавт. (1975). Применяют непрерывную трис-цитратную буферную систему pH 7,2. Электродный буфер: 0,2 М раствор триса, доведенный до pH 7,2 лимонной кислотой. Гелевый буфер: электродный, разведенный дистиллированной водой 1:4. Электрофорез проводят 2 ч при напряжении 14 В и циркуляционном охлаждении. По мнению многих авторов, использовавших различные разделяющие среды, самые эффективные результаты получались при использовании электрофореза в геле агарозы.

Метод электрофореза в тонком слое крахмального геля по B. Parkin и E. Adams (1975). Готовят блок 12% крахмального геля размером 20 см ×15 см × 1 мм. Используют как непрерывную фосфатную буферную систему с pH 7,4 по A. Stöhlmacher и W. Haferland, так и прерывистую трис-цитратно-боратно-гидроксидлитиевую систему с pH 6,8 по D. Hopkinson и соавт. Высоковольтный электрофорез проводят 3 ч при напряжении 12—14 В/см и циркуляционном охлаждении.

Ферментативную активность электрофоретически разделенных групповых изоформ эритроцитарной ЭсD выявляли по методике, предложенной D. Hopkinson и соавт. (1973). Специфичным для ЭсD субстратом является 4-метил-умбеллиферрилацетат (или бутират).

Фермент, расщепляя этот субстрат, освобождает люминесцирующий в ультрафиолетовых лучах умбеллиферрон.

На гель накладывают фильтровальную бумагу, смоченную следующим раствором: 2—3 мг субстрата растворяют в 1 мл ацетона и добавляют 10 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,2. Аппликацию проводят 5—10 мин при комнатной температуре, после чего фильтровальную бумагу удаляют, поверхность геля промывают дистиллированной водой, а затем гель подвергают ультрафиолетовому облучению (λ=360 нм) в темном помещении: зоны изоферментов люминесцируют.

Частота встречаемости аллелей *ЭсD*[1] и *ЭсD*[2] среди европейского населения составляет в среднем соответственно 88 и 12%.

K. Bender и R. Frank (1974) в одной немецкой семье впервые выявили новый необычный фенотип эритроцитарной ЭсD, передающийся по наследству. Характер изоферментного спектра ЭсD этого фенотипа, при котором, помимо изоферментов, свойственных обычному гомозиготному фенотипу ЭсD-1, наблюдались необычные изоформы, свидетельствовал о его генотипической гетерози-

готности по обычному аллелю $ЭсD^1$ и атипичному, обозначенному аллелем $ЭсD^3$. Вскоре атипичный гетерозиготный фенотип ЭсD-3-1 обнаружили и другие исследователи.

K. Berg и соавт. (1976) описали еще один гетерозиготный фенотип и обозначили его ЭсD-4-1. Это свидетельствовало о существовании в генном локусе системы ЭсD еще одного редкого атипичного аллеля — $ЭсD^4$ T. Suzuki и соавт. (1978) при исследовании полиморфизма ЭсD среди 2367 не связанных родством японцев выявили редкие гетерозиготные варианты ЭсD-3-2 в двух случаях и в одном случае еще один, появление которого связано, по-видимому, с действием еще одного атипичного аллеля в генном локусе системы ЭсD.

Четкий аутосомально-кодоминантный порядок наследования групп эритроцитарной ЭсD, прослеженный на обширном материале, позволяет использовать полиморфизм этой генетически детерминированной ферментной системы в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей. D. Dykes и H. Polesky (1977) оценили информативность системы ЭсD при использовании ее в экспертизах. Полиморфизм эритроцитарной ЭсD авторы исследовали в 206 экспертизах спорного отцовства: из 39 исключений в 5 случаях мужчины, не являвшиеся фактическими отцами того или иного ребенка, были исключены только по генетическим маркерам этой системы. По данным O. Prokop и W. Göhler (1976), вероятность исключения отцовства по системе ЭсD для европейского населения составляет приблизительно 9—10%. Учитывая гораздо более частую частоту встречаемости аллеля $ЭсD^2$ среди монголоидных популяций, можно утверждать, что процентная вероятность исключения мужчин, ложно указанных в качестве отца, по системе ЭсD в этой популяции будет значительно выше.

Хотя существование в генном локусе системы ЭсD «немого» аллеля $ЭсD^0$ еще не доказано, B. Brinkmann и K. Püschel (1978) полагают, что надо быть осторожным при исключении отцовства или материнства по противоположной гомозиготности этой системы. Авторы особо обращают внимание на тот факт, что из-за низкой субстратной специфичности фермента трудно дифференцировать уменьшение выраженности изоферментов ЭсD при гетерозиготной форме по основному и «немому» аллелю от снижения выраженности изоферментов ЭсD. Это свя-

зано с использованием того или иного субстрата. Кроме того, авторы справедливо отмечают, что, поскольку до настоящего времени не разработан формазановый гистохимический метод для обнаружения активности ЭсD, генетически обусловленный полиморфизм фермента приходится выявлять с помощью люминесцентного метода, при котором интенсивность свечения может зависеть также и от технических факторов, длины волны ультрафиолетовых лучей и др. Еще не созданы методы точного колориметрического определения активности ЭсD. Все это, конечно, не относится к случаям исключения отцовства, когда, например, мать ребенка и его предполагаемый отец имеют любой одинаково гомозиготный фенотип, а ребенок — гетерозиготный фенотип ЭсD-2-1.

H. Schmechta (1977) отмечал изменение и ослабление групповых изоферментных спектров ЭсD при хранении проб крови. Из этого следует, что в экспертных исследованиях необходимо использовать только свежеприготовленные гемолизаты эритроцитов.

Глава 24

СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ ГЛИОКСАЛАЗЫ I

Глиоксалаза I (ГлО) (К.4.4.1.5) катализирует расщепление S-лактоилглутатиона на метилглиоксаль и глутатион.

J. Kömpf и соавт. (1975) при электрофорезе гемолизатов эритроцитов крови различных людей с последующим выявлением активности ГлО наблюдали три различных изоферментных спектра. Авторы предположили, что полиморфизм ГлО имеет генетическую природу. Результаты семейных обследований подтвердили правильность этого предположения. По предложенной авторами гипотезе наследования групп эритроцитарной ГлО, в едином аутосомальном генном локусе этой системы действует пара кодоминантных аллельных гена — *ГлО*[1] и *ГлО*[2]. Эти аллели обусловливают появление трех фенотипов: двух генотипически гомозиготных по соответствующему аллелю (фенотипы ГлО-1 и ГлО-2) и одного генотипически гетерозиготного (фенотип ГлО-2-1).

P. Khan и B. Doppert (1976), подтвердив открытый J. Kömpf и соавт. (1975) генетически обусловленный полиморфиз эритроцитарной ГлО, на основании электрофоретической картины групповых изоферментов при трех фенотипах (по одному изоферменту в гомозиготных фе-

нотипах ГлО-1 и ГлО-2 и трем изоферментам в гетерозиготном фенотипе ГлО-2-1) предположили, а потом и доказали, что функциональная молекула фермента является димером. Интерес к этой ферментной системе в последнее время повысился потому, что была установлена локализация ее генного локуса на аутосомальной хромосоме № 6 и доказано тесное сцепление генных локусов системы тканевой совместимости, или системы тканевых антигенов HLA. Далее было показано, что генный локус системы ГлО тесно сцеплен и с генным локусом *ФГМ*$_3$. Для разделения групповых изоферментов эритроцитарной ГлО предложено большое число электрофоретических методов. Остановимся лишь на наиболее распространенных.

Электрофорез в крахмальном геле по J. Kömpf и соавт. (1975). Используют непрерывную трис-HCl гистидин-буферную систему, pH 7,8. Электродный буфер: 0,2 М трис-гистидиновый буфер, pH 7,8. Гелевый буфер: электродный, разведенный дистиллированной водой 1 : 10. Электрофорез проводят 14 ч при 2 °С и напряжении 7 В/см.

Электрофорез в крахмальном геле по P. Kühnl и соавт. (1977). Применяют непрерывную фосфатно-натриевую буферную систему, pH 6,7. Электродный буфер: 0,2 М фосфатно-натриевый буфер, pH 6,7. Гелевый буфер: 0,0075 М фосфатно-натриевый буфер, pH 6,7. Электрофорез проводят 3 ч при напряжении 10 В/см и циркуляционном охлаждении.

Электрофорез в крахмальном геле по A. Ghosh (1977). Используют непрерывную трис-боратно-цитратно-гидроксидлитиевую буферную систему, pH 7,2. В электродном буфере содержится 0,2 М электролитов, pH 7,2. Гелевый буфер: электродный, разведенный дистиллированной водой 1 : 10. Электрофорез проводят 18 ч при +10 °С и напряжении 4 В/см.

Электрофорез в ацетатцеллюлозном геле (целлогеле) по P. Khan и B. Doppert (1976). Электрофорез осуществляется на пластинах целлогеля размером 16 см × 17 см × 0,5 мм. Используют трис-барбитуровую буферную систему, pH 8,0. Буфер: 0,03 М триса, 0,03 М барбитуровой кислоты, 0,2 мл β-меркаптоэтанола и 0,4 мл 1 М $MgCl_2$ в 1 л дистиллированной воды. Гемолизаты эритроцитов в количестве 2 мкл наносят в катодную зону целлогеля, электрофорез проводят при постоянном напряжении тока 200 В в течение 3 ч при комнатной температуре (без охлаждения геля и электродных буферных сосудов).

Высоковольтный электрофорез в геле агарозы по W. Martin и A. Ott (1977). Используют непрерывную фосфатную буферную систему, pH 7,4. Электродный буфер: 0,2 М фосфатно-натриевого электролита. Гелевый буфер: тот же электролит в концентрации 0,02 М. Электрофорез проводят 2 ч при напряжении 15 В/см и циркуляционном охлаждении.

Активность групповых изоферментов ГлО выявляют по методу J. Kömpf и соавт. (1975). На поверхность целлогеля (или геля агарозы, на продольно разрезанную поверхность крахмального геля) накладывают фильтровальную бумагу, смоченную 0,2 М фос-

фатным буфером, pH 6,8, содержащим 257 М метилглиоксаля и 16,3 мМ восстановленного глутатиона. Гель, покрытый фильтровальной бумагой, помещают в термостат при 37 °С на 30 мин, после чего бумагу удаляют и на поверхность геля наносят агаровую аппликацию [1% расплавленный агар, содержащий МТТ (1,2 мг на 1 мл) и следы дихлорфенолиндофенола, в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 8,5]. Гель снова помещают в термостат при 37 °С на 15—20 мин до появления бледных зон ферментативной активности на зеленовато-голубом фоне геля. P. Khan и B. Doppert (1976) рекомендуют несколько иной способ.

Готовят два раствора. Раствор № 1: 1,6 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 100 мкл метилглиоксаля, 12 мг восстановленного глутатиона и 0,4 мл раствора МТТ (2 мг/мл). Раствор № 2: 1,8 мл 0,1 М трис-HCl-буфера, pH 7,8, и 0,2 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (2 мг/мл). После электрофореза на гелевую поверхность заливают свежеприготовленный раствор № 1. Через несколько секунд гель слегка промокают фильтровальной бумагой и сразу же заливают раствором № 2. После 15—20-минутной инкубации во влажной камере при комнатной температуре производят учет результатов. Зоны ферментативной активности проявляются в виде пурпурных полос на зеленовато-голубом фоне геля.

Ферментная система эритроцитарной ГлО весьма информативна для экспертизы спорного отцовства благодаря высокой частоте встречаемости двух ее основных аллелей, обусловливающих генетически детерминированный полиморфизм системы. Частота встречаемости основных аллелей особенно велика в европеоидной популяции. Например, по данным P. Koziol и T. Dobosz (1978), эта величина среди населения Польши составляет для аллелей *ГлО*[1] и *ГлО*[2] соответственно 44,27 и 55,73%, что позволяет только по этой системе «исключить» 18,46% мужчин, ложно указанных в качестве отцов. Для подтверждения формально-генетической гипотезы о двуаллельном кодоминантном аутосомальном порядке наследования групп эритроцитарной ГлО авторы обследовали 372 пары мать — ребенок. Как и ожидалось, ни разу не была обнаружена противоположная гомозиготность по аллелям ГлО у ребенка и его матери.

С этой же целью P. Khan и B. Doppert (1976) обследовали 11 так называемых «критических» родительских пар, в которых оба родителя имели один и тот же или различный гомозиготный фенотип по системе ГлО. При этом все 47 детей, родившихся в этих семьях, имели единственно возможный для них гомо- или гетерозиготный фенотип: ГлО-1×ГлО-1 (1 родительская пара — все четверо детей имели фенотип ГлО-1), ГлО-2×ГлО-2 (6 пар — все 23 ребенка имели фенотип ГлО-2), ГлО-1×

×ГлО-2 (4 пары — все 20 детей имели фенотип ГлО-2-1).

Многие исследователи указывают на полную онтогенетическую сформированность групп эритроцитарной ГлО к моменту рождения ребенка. Это является чрезвычайно важным моментом для использования генетически обусловленного полиморфизма этой системы в экспертизах спорного отцовства при ранних сроках жизни оспариваемого ребенка.

Интересно, что до сих пор среди различных в популяционном отношении этнических групп еще ни разу не был выявлен необычный фенотип, являющийся генетическим продуктом какого-либо атипичного структурального аллеля в генном локусе системы ГлО. Такую мономорфность системы ГлО, без каких-либо атипичных структуральных аллелей в генном локусе, можно сравнить лишь с некоторыми изосерологическими эритроцитарными системами, поскольку в подавляющем большинстве сывороточных и во всех известных генетически детерминированных ферментных системах крови человека такие аллели в соответствующих генных локусах уже найдены.

Для судебных медиков, использующих полиморфизм системы эритроцитарной ГлО в экспертизах спорного отцовства, небезынтересна противоположная гомозиготность по этой системе между женщинами и их детьми в трех поколениях одной немецкой семьи [Rittner Ch., Weber W., 1978]. Возможность перепутывания детей исключалась. Во всех случаях наблюдения противоположной гомозиготности между матерями и их детьми по системе ГлО выраженность изоферментного спектра при якобы гомозиготных фенотипах ГлО-1 и ГлО-2 была резко снижена. Это свидетельствовало о дефиците ферментативной активности и генотипической гетерозиготности по обычному структуральному и «скрытому», или «немому», аллелю *ГлО*^{0}. «Немой» аллель в гетерозиготной форме обусловливает снижение активности фермента в эритроцитах почти на 50% по сравнению с нормой.

Возможность наследственной передачи аллеля *ГлО*^{0}, маскирующая истинную гетерозиготность мнимой гомозиготностью, нужно учитывать при проведении экспертиз спорного происхождения детей. Во всех случаях исключения отцовства или материнства по противоположной гомозиготности системы ГлО (так же как и по противоположной гомозиготности других ферментных генетически детерминированных систем крови человека) судеб-

но-медицинский эксперт обязан выявить активность противоположно гомозиготных групп фермента (либо по интенсивности окрашивания изоферментов, либо путем непосредственного количественного колориметрического измерения активности). При снижении активности фермента в первую очередь надо думать о наследственной передаче аллеля *ГлО*^{0}. Это можно доказать с помощью расширенного исследования групп ГлО в эритроцитах крови ближайших родственников ответчика.

Глава 25

СИСТЕМА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Сывороточная щелочная фосфатаза (СЩФ, Pp) (КФ 3.1.3.1) катализирует реакцию присоединения H_2O к моноэфиру ортофосфорной кислоты, в результате которой образуются спирт и ортофосфат. Этот фермент характеризуется высокой органной и тканевой специфичностью. Boyer (1963) с помощью электрофореза и иммунной абсорбции специфической антиферментной сыворотки выявил меж- и внутриорганные антигенные подклассы щелочной фосфатазы. В 1-й подкласс Pp входят тканевые фосфатазы печени, костей, почек и селезенки, во 2-й — щелочная фосфатаза кишечника и в 3-й — щелочная фосфатаза плаценты при беременности. Ферменты 2-го и 3-го подклассов часто дают перекрестные реакции. Изоферменты Pp, выявляемые в плазме (или сыворотке) крови человека, имеют печеночное, костное и интестинальное, а изоферменты при беременности — плацентарное происхождение [Warnock M., 1966].

K. Arfors и соавт. (1963), используя электрофорез в крахмальном геле с последующим выявлением активности изоферментов СЩФ, обнаружили две генетически обусловленные группы Pp1 и Pp2. Группа Pp1 характеризовалась одним быстро мигрирующим к аноду изоферментом А, имеющим печеночное или костное происхождение, а группа Pp2 — двумя изоферментами А и В; изофермент В, обладающий меньшей скоростью миграции к аноду, имел интестинальное происхождение. Изофермент А, присутствующий, как правило, во всех образцах сыворотки крови, под действием нейроаминидазы теряет электрофоретическую подвижность, что обусловлено ре-

дукцией остатков сиаловой кислоты. Изофермент В, встречающийся в крови людей различных популяций с разной частотой, специфически ингибируется L-фенилаланином, его электрофоретическая подвижность не изменяется при действии нейроаминидазы.

Интенсивность проявления на электрофореграммах изофермента В в различных образцах сывороток крови группы Pp2 может значительно изменяться. Более того, она может быть разной в образцах сыворотки, взятых у одного и того же лица в различное время. Иногда наблюдались дополнительные фракции в зоне А, что, по-видимому, обусловлено дефицитом сиаловой кислоты.

M. Langman и соавт. (1966) установили, что активность изофермента В группы Pp2 может значительно возрастать при потреблении жирной пищи. При этом у некоторых людей, предварительно классифицируемых исключительно по типу фосфатазы Pp1 (зона А), отмечалось повышение ферментативной активности в зоне В, что могло привести к ошибочной интерпретации фосфатазной группы Pp2. Однако в таких случаях маскировку истинного фенотипа Pp1 «жировым» изоферментом В, характерным для фенотипа Pp2, можно легко обнаружить с помощью обработки L-фенилаланином, который тормозит активность истинно кишечного изофермента В группы Pp2 и не снижает активность «жирового» изофермента В группы Pp1. Это нужно учитывать при интерпретации фенотипов Pp как в популяционно-генетических и семейных исследованиях, так и в судебно-медицинских экспертизах, особенно при использовании генетически детерминированного полиморфизма этой сывороточной ферментной системы в экспертизах спорного происхождения детей.

Характер наследования групп СЩФ довольно сложный, некоторые детали этого механизма до конца не выяснены, что, безусловно, затрудняет использование полиморфизма Pp в судебно-медицинских экспертизах. Более того, многочисленные семейные обследования, проведенные в различных в расовом отношении популяциях, свидетельствуют о возможности рождения детей с группой Pp2 в семьях, в которых оба родителя имеют группу Pp1, и наоборот. Такие данные на первый взгляд свидетельствуют о невозможности использования групп Pp1 и Pp2 в качестве генетических маркеров при решении вопроса о возможности или невозможности рождения ребенка от

конкретной родительской пары. Однако особенности генетической корреляции полиморфизма системы СЩФ со многими изосерологическими системами крови человека [АВО (Н), Льюис, Даффи] и особенно с генетически детерминированной системой выделительства (Se-se), по-видимому, изменят это сложившееся мнение.

K. Arfors и соавт. (1963) обратили внимание на определенную корреляцию групп Pp1 и Pp2 с системой АВО (Н), что свидетельствовало о тесном сцеплении генных локусов, аллели которых обусловливают полиморфизм этих систем. Эта корреляция проявлялась в том, что в эритроцитах у подавляющего числа лиц с фенотипом Pp2 не было антигена А системы АВО (Н), т. е. эти люди имели группы крови 0 (I) или В (III). В то же время фенотип Pp1 почти всегда наблюдался у людей, имеющих в эритроцитах антиген А, т. е. относящихся к группам A_1, A_2, A_1B или A_2B. Эту же безусловно тесную, но не абсолютную положительную генетическую корреляцию аллелей, контролирующих реализацию антигенов A_1 и A_2 системы АВО (Н) и фенотипа Pp1, наблюдали также Т. Т. Сорокина, Л. В. Богданов (1973), В. А. Спицын, О. В. Ирисова, И. В. Перевозчиков (1976), В. А. Спицын (1978), L. Beckman (1964) и другие авторы у представителей различных этнических групп. Например, при обследовании 626 не связанных родством жителей г. Москвы А. С. Гладких и Д. Г. Гадакчян (1973) выявили 174 человека с фенотипом Pp2, у 86,2% из этих лиц (86,2%) в эритроцитах не было антигенов A_1 и A_2, т. е. они имели группы крови 0(I) или В(III). Полученные данные подтверждают отмеченную ранее положительную корреляцию фосфатазного компонента В, обусловливающего фенотип Pp2, с группами крови О и В и отрицательную корреляцию — с группами А и АВ.

Для практического использования генетически обусловленной системы выделительства в судебно-медицинских экспертизах спорного происхождения детей большое значение имеет тесная связь групп Pp1 и Pp2 с изосерологической системой Льюис и феноменом выделительства. При изучении возможных корреляций между полиморфизмом сывороточной щелочной фосфатазы и другими генетически обусловленными маркерами крови человека K. Arfors и соавт. (1963) отметили, что ни у одного лица с группой крови Le (a+b—), являющихся невыделителями групповых субстанций АВН, не было группы Pp2 и

все они имели группу Pp1. Авторы предположили, что существует тесная связь групп Pp1 и Pp2 не только с системой Льюис, но и системой выделительства групповых субстанций АВН.

L. Beckman (1964) на обширном семейном материале, включающем обследования 1307 шведов, доказал абсолютную корреляцию в наследственной передаче аллеля Pp^2, контролирующего появление в сыворотке крови изофермента В, характерного для группы Pp2, и аллеля *Se*, обусловливающего выделительство групповых субстанций АВН системы АВ0 (Н).

Помимо двух основных электрофоретических фенотипов СЩФ, описаны случаи наследственной передачи атипичных фенотипов, электрофоретическая картина которых представлена на рис. 21 (см. стр. 218). C. Bouloux и соавт. (1972), исследуя полиморфизм СЩФ у негритянского населения Сенегала, выявили необычный электрофоретический фенотип фермента, характеризующийся наличием только одного изофермента PpB. Эта изоформа СЩФ была обнаружена в двух поколениях некоторых семей, что доказывало генетическую обусловленность изофермента. По аналогии с другими двуаллельными генетическими системами, полиморфизм которых выявляется с помощью электрофореза (в гомозиготных фенотипах один, а в гетерозиготных два компонента), авторы назвали этот фенотип $Pp_{(2-2)}$, а два обычных фенотипа Pp1 и Pp2 соответственно обозначили $Pp_{(1-1)}$ и $Pp_{(2-1)}$. Однако, если допустить, что фенотип $Pp_{(1-1)}$ является генотипически гомозиготным Pp^1/Pp^1, а фенотип $Pp_{(2-1)}$ — генотипически гетерозиготным Pp^1/Pp^2, то, исходя из частоты встречаемости двух основных фенотипов системы СЩФ, трудно объяснить крайне низкую частоту встречаемости гомозиготного фенотипа $Pp_{(2-2)}$. По мнению некоторых исследователей (В. А. Спицын, 1978, и др.), генетическая интерпретация таких атипичных фенотипов станет возможной, лишь когда накопятся подробные генетические и, возможно, клинические данные о носителях этих фенотипов.

Тем не менее атипичные варианты Pp обозначали в соответствии с гипотезой C. Bouloux и соавт. (1972) о генотипической гетерозиготности фенотипа $Pp_{(2-1)}$: $Pp_{(3-1)}$, $Pp_{(3-2)}$, $Pp_{(4-2)}$ и т. д. (см. рис. 21).

Высокая частота встречаемости фенотипа Pp2 (25—30%) при отсутствии «вариантного» фенотипа $Pp_{(2-2)}$

(что наблюдается в европеоидных популяциях) ставит под сомнение правильность предположения C. Bouloux и соавт. (1972) о том, что основные фенотипы СЩФ Pp1 и Pp2, а также атипичный фенотип $Pp_{(2-2)}$ обусловлены действием двух кодоминантных аллельных генов Pp^1 и Pp^2. Скорее всего, в генном локусе этой системы действуют два основных аллеля — доминантный Pp^2, генетически реализующий изофермент B, характерный для фенотипа Pp2, и антитетический по отношению к нему рецессивный аллель Pp, который не реализует появление изофермента B. В таком случае следует признать, что фосфатазный изофермент A, выявляемый почти во всех образцах сывороток крови, является генетическим продуктом какого-то структурального аллеля в другом мономорфном генном локусе сывороточной щелочной фосфатазы (аллеля Pp^1). Исходя из этого, основной фенотип Pp1 генотипически является гомозиготным по широко распространенному рецессивному аллелю Pp (Pp/Pp), а фенотип Pp2 — либо гетерозиготным (Pp^2/Pp), либо гомозиготным (Pp^2/Pp^2), причем в последнем случае выраженность изофермента B в сыворотке крови значительно выше. Полученные отечественными авторами данные [Гладких А. С., Гадакчян Д. Г., 1973] подтверждают эту гипотезу и согласуются с результатами K. Bamford и соавт. (1965), которые подразделили всех людей на три фенотипа СЩФ: P^0 (Pp1, генотип Pp/Pp), P^+ (Pp2, генотип Pp^2/Pp) и P^{++} (Pp2, генотип Pp^2/Pp^2).

По нашему мнению, для судебно-медицинских экспертов, пытающихся использовать в экспертизах спорного происхождения детей генетически обусловленную систему Se-se, большой интерес представляет абсолютная генетическая корреляция аллеля Pp^2 с аллелем Se генного локуса системы выделительства. Такая связь свидетельствует, во-первых, о тесном сцеплении генных локусов систем Pp и Se-se и, во-вторых, о гаплотипичном порядке наследования аллелей двух тесно сцепленных локусов. Данные многочисленных семейных и популяционно-генетических обследований показывают, что существуют три основных гаплотипа этих тесно сцепленных систем (PpSe, Ppse и Pp^2Se) и отсутствует гаплотип Pp^2se. Такая генетическая интерпретация позволяет, правда, признать возможность рождения в родительских парах Pp2×Pp2 детей с фенотипом Pp1, но не наоборот, как это наблюдается в действительности. Поэтому до окончательного выяснения всех

тонкостей генетических взаимосвязей этой сывороточной ферментной системы изолированное использование ее полиморфизма в судебно-медицинских экспертизах в делах о спорном происхождении детей невозможно. Однако абсолютная корреляция фосфатазного фенотипа Pp2 с феноменом выделительства открывает возможности использования групп Pp в качестве незаменимого генетического признака, позволяющего применять в таких экспертизах полиморфизм генетически детерминированной системы Se-se.

Известно, что категории выделительства и невыделительства групповых антигенов АВН системы АВ0 (Н) генетически обусловлены и, следовательно, передаются по наследству. Однако применение на практике системы выделительства в экспертизах спорного отцовства встречается с определенными трудностями. Принадлежность того или иного лица к выделителям или невыделителям антигенов АВН определяют по выраженности этих антигенов в слюне; этот показатель значительно варьирует даже в пределах одного и того же фенотипа (Se и se). Кроме того, в настоящее время высокочувствительными методами абсорбции — элюции и «смешанной» агглютинации в слюне любого невыделителя можно выявить агглютиногены системы АВ0, соответствующие его группе крови, что объективно затрудняет дифференцирование двух этих генетически детерминированных категорий выделительства.

Антигены системы Льюис, также непосредственно коррелирующие с системой выделительства при их онтогенетической сформированности, во многих случаях позволяют определить, является ли определенное лицо выделителем или невыделителем групповых антигенов системы АВ0(Н). Известно, что лица с группой крови Le(a+b—) являются невыделителями, а с группой крови (Le(a—b+) — выделителями групповых антигенов АВН. Лица, имеющие фенотип Le(a—b—), могут быть как выделителями, так и невыделителями групповых антигенов системы АВ0(Н). Из этого следует, что и по изосерологической системе Льюис [если нет довольно дефицитных сывороток анти-Le(c) и анти-Le(d)] не всегда можно определить генетически детерминированную категорию выделительства или невыделительства. Главным же препятствием, затрудняющим использование системы Льюис в экспертизах спорного отцовства, является позднее онтогенетическое формирование ее групповых антигенов в эритроцитах, ко-

торое заканчивается приблизительно к 5—6-му году жизни ребенка (подавляющее же большинство судебно-медицинских экспертиз проводится в ранние сроки жизни ребенка).

По нашему мнению, генетически обусловленную систему выделительства в экспертизах спорного отцовства можно использовать лишь в следующем виде. Первый этап — исследование категорий выделительства у всех проходящих по делу лиц по выраженности групповых антигенов АВН в слюне, применяя при этом количественный метод абсорбции агглютининов и ни в коем случае не используя методы абсорбции — элюции или «смешанной» агглютинации. Если в слюне ребенка групповые антигены системы АВ0(Н) выявляются отчетливо, а в слюне его матери и ответчика либо не выявляются совсем, либо очень незначительно (1—2 ступени снижения титра абсорбированных сывороток), то обязательно проводят второй этап исследования — установление фенотипов системы Льюис у ответчика и матери ребенка. Принадлежность их к группе Le(a+b—) подтверждает и принадлежность к генетически детерминированной системе невыделительства групповых антигенов АВН, а принадлежность к группе Le(a—b—) не исключает такой возможности. Однако и в том и в другом случае подобные исследования не позволяют исключить отцовство ответчика. Такое исключение может быть произведено лишь после определения групп СЩФ у ребенка, матери и предполагаемого отца, причем только в том случае, если ответчик и мать ребенка имеют фенотип Pp1 (могут быть невыделителями!), а ребенок — фенотип Pp2 (только выделитель!).

На первый взгляд это выглядит парадоксально, поскольку многочисленные наблюдения свидетельствуют о возможности рождения детей с фенотипом Pp2 у родителей с фенотипом Pp1. Так, L. Beckman (1964) наблюдал 119 семей, в которых оба родителя имели фенотип Pp1, причем из 444 родившихся в этих семьях детей 50 имели фенотип Pp2, характерный для выделителей. При обследовании родителей этих 50 детей на категории выделительства [определялась выраженность антигенов АВН системы АВ0(Н) в их слюне и исследовались группы системы Льюис] оказалось, что либо отец, либо мать, либо оба родителя являлись выделителями групповых антигенов АВН. Были найдены еще 5 семей с 24 детьми, в ко-

торых оба родителя являлись невыделителями и имели фенотип Pp1, причем все дети в этих семьях также были невыделителями и имели фенотип Pp1.

Перспектива использования полиморфизма СЩФ в судебно-медицинских экспертизах спорного отцовства имеет достаточно объективные предпосылки. Однако прежде чем рекомендовать применение групп Pp в качестве генетического признака, сцепленного с феноменом выделительства, мы проверили, действительно ли группа Pp2 свидетельствует о выделительстве по системе AB0(H) и каковы сроки онтогенетического формирования фосфатазных групп [Гладких А. С., Гадакчян Д. Г., 1973].

Из 174 лиц с фенотипом Pp2 у 155 мы выявили группу Le (a—b+), что свидетельствовало о принадлежности их к выделителям. У 19 других людей был фенотип Le (a—b—), однако при исследовании их крови сыворотками анти-Le(c) и анти-Le(d) было установлено, что все они имели фенотип Le(d+), т. е. также являлись выделителями групповых антигенов системы AB0(H). Таким образом, группа Pp2 встречается только у выделителей.

Для того чтобы установить, обладают ли новорожденные полностью сформированной, собственной, а не материнской, группой Pp, исследовали сыворотку крови 40 пар мать — ребенок. В 32 случаях фосфатазные группы ребенка и его матери совпадали (в 23 парах — группа Pp1 и в 9 парах — группа Pp2), а в 8 случаях наблюдалась дискордантность, свидетельствующая о полной онтогенетической сформированности групп Pp к моменту рождения ребенка.

Для электрофоретического разделения групповых изоферментов Pp в крахмальном геле наиболее эффективной оказалась буферная система следующего состава. Раствор № 1: 1,2 г гидроксида лития и 11,9 г H_3BO_3 в 1 л дистиллированной воды, pH 8,6. Раствор № 2: 1,6 г лимонной кислоты и 6,3 г триса в 1 л дистиллированной воды, pH 8,6. Электродный буфер: раствор № 1, гелевый буфер: 1 часть раствора № 1 и 9 частей раствора № 2. Электрофорез проводили в 13% крахмальном геле при напряжении 13—15 В/см в течение $3^1/_2$ ч при 4° С. Ферментативную активность выявляли по методу K. Arfors и соавт. (1963). Инкубационная смесь: 100 мл ацетатного 0,1 М буфера pH 5,6, содержащего по 100 мг α-нафтилфосфата и прочной гранатовой GBC-соли, по 10 капель 10% раствора $MgCl_2$ и $MnCl_2$, 0,5 г поливинилпирролидона и 2 г NaCl. Инкубацию проводили 3 ч при 37° С. Фореграмму в течение 12 ч обрабатывали в смеси: вода — метанол — ледяная уксусная кислота в соотношении 5:5:1.

Раздел IV
СИСТЕМА АНТИГЕНОВ HLA

J. Dausset (1958) открыл первый лейкоцитарный антиген человека. В дальнейшем были выявлены другие такие антигены, имеющиеся почти во всех содержащих ядро клетках человека. В 1968 г. все лейкоцитарные антигены объединили в систему, получившую наименование HLA. Стабильность генетического детерминирования, высокая степень полиморфизма, завершение формирования системы HLA в ранние сроки онтогенеза, независимость ее от других систем крови делают систему тканевых антигенов весьма перспективной для использования в судебно-медицинской практике. К настоящему времени система HLA включает 77 различных антигенов. Все антигены обозначают символом системы, за которым указывают название локуса и цифру, обозначающую порядковый номер антигена: HLA-AI, HLA-BW16. Антигены, открытые несколькими исследователями, но нуждающиеся в дальнейшем уточнении, обозначаются буквой W (Workshop — рабочие названия). В литературе можно также встретить синонимы антигенов HLA: антигены тканевой совместимости, или гистосовместимости, трансплантационные, тканевые.

Четыре тесно сцепленных локуса контролируют антигены HLA, они локализованы на хромосоме № 6. Три локуса *A*, *B* и *C* контролируют серологически определяемые антигены лейкоцитов и других тканей; четвертый локус *D* расположен проксимальнее от локуса *B*, контролируемые им антигены выявляются в смешанной культуре лимфоцитов (реакции клеточного иммунитета).

В многочисленных семейных исследованиях установлено, что ребенок наследует по одной хромосоме, несущей гены HLA каждого из родителей, т. е. по одному гаплотипу — материнскому и отцовскому. Например, у родителей с гаплотипами:

Отец A1, B8	Мать A3, B7
A2, B12	A9, B5

могут быть дети со следующими сочетаниями гаплотипов системы HLA:

1-й ребенок	A2, B12, A3, B7
2-й »	A1, B8, A3, B7
3-й »	A1, B8, A9, B5
4-й »	A2, B12, A9, B5
5-й »	A2, B12, A9, B5

и т. д. (остальные комбинации происходят за счет повторений).

Таким образом, один человек по локусу A и B обладает максимум четырьмя генами, при наличии гомозиготности по одному или двум HLA-генам генотип соответственно состоит из трех или минимум двух HLA-антигенов. На основании сочетания антигенов HLA без учета их расположения на хромосоме можно установить фенотип HLA при обследовании неродственных лиц.

Характерной особенностью системы HLA является высокая степень полиморфности и разнообразия входящих в нее отдельных антигенов. Для локуса A известно 20, для локуса B-33, для локуса C-6 и локусов D и DR — 18 антигенов. Разнообразные комбинации между антигенами, контролируемыми различными локусами, обусловливают огромное число теоретически возможных и действительно обнаруженных гаплотипов. Так, J. Dausset (1973) теоретически рассчитал более 35 000 возможных генотипов HLA, учитывая 14 аллелей локуса A и 19 аллелей локуса B. Если учесть число комбинаций, исходя из известных к настоящему времени специфичностей HLA, то каждая антигенная формула практически приблизится к индивидуальной. Именно это свойство особенно ценно для судебно-медицинской практики при проведении экспертиз спорного происхождения детей.

Система HLA является наиболее сложной иммуногенетической системой человека. Примером могут служить перекрестные реакции, происхождение которых можно объяснить биохимическим сходством антигенов и гетерогенностью антител, вырабатываемых против определенных антигенов. Впервые такие реакции были выявлены в отношении антигенов A2 и A28 [Dausset J. et al., 1968; Kiaameger-Nielsen F., 1968]. Затем обнаружили перекрестные реакции между другими антигенами: A1, A3 и

A11; B5, BW35 и B15; B27 и B40. Перекрестные реакции затрудняют получение моноспецифических сывороток, осложняют учет результатов при определении фенотипов, вследствие чего это явление должно быть всегда под контролем и о нем необходимо хорошо знать. HLA-локусы тесно связаны между собой. Одним из доказательств такого сцепления являются обнаруженные между ними рекомбинации, которые у женщин встречаются чаще, чем у мужчин. Предполагают также, что локус системы HLA сцеплен с локусом, контролирующим иммунный ответ. К настоящему времени наиболее убедительным доказательством в пользу сцепления генов HLA с генами Ir являются данные, полученные D. Marsh и соавт. (1973). Авторы обнаружили связь между антигенами B7, B40, B27, B17, BW22 и аллергическими заболеваниями, причем у больных наблюдалось повышенное образование антител. Отмечена также связь генов системы HLA с системой фермента фосфоглюкомутазы — PGM_3 [Lamm L. et al., 1972]. Сцепление локусов системы HLA с полом, а также с локусами систем крови (AB0, Rh, MNSs, K, Ik, Fy, Le, Hp, Tf, Gm, Gc, Lp, Ag, Xg, Ko) не отмечается, относительно сцепления с локусами системы P нет единого мнения.

Антигены HLA располагаются на клеточных мембранах в виде небольших линейных участков протяженностью 0,1—0,3 нм, обнаруживаются почти во всех клетках и тканях организма, но в разном количестве. Если принять содержание антигенов HLA в селезенке за 100%, то в других органах их количество составит: в легких 50%, в печени 40%, тонком кишечнике 30%, почках 25%, сердце и желудке 10%, аорте и мозге 5% [Berach M. et al., 1970]. HLA-антигены обнаружены в эндотелии сосудов, коже, сперматозоидах, фибробластах и др. Предполагают, что они есть и на эритроцитах. Некоторые HLA-антигены в растворимой форме обнаружены в семенной жидкости и сыворотке крови человека.

Тканевые антигены формируются во внутриутробном периоде [Seigler H. F. et al., 1969, и др.]. Они обладают значительной устойчивостью к воздействию внешней среды. Так, HLA-антигены сохранились в мышцах мумий более двухтысячелетней давности захоронения [Hossaini A. et al., 1975]. Этот факт свидетельствует о возможности определения HLA-антигенов в высушенных тканях (тем более в пятнах крови).

В последние годы большое внимание уделяют изучению структуры HLA-антигенов. Известно, что они входят в сложный комплекс гликопротеидов и липидов клеточных мембран, представляющий собой иммуноглобулины, молекула которых состоит из двух полипептидных цепей. Одна из цепей идентична β_2-макроглобулину, с молекулярной массой 11 000 дальтон, вероятно, она свойственна всем HLA-антигенам. Другой компонент полипептидной цепи с молекулярной массой около 31 000 дальтон специфичен для каждого HLA-антигена [Solheim B., Thorsby E., 1974, и др.].

Типирование по системе HLA невозможно без соответствующих сывороток, источником которых пока еще остается кровь человека. Принципы получения сывороток анти-HLA разработал J. Dausset (1958) при изучении свойств антилейкоцитарных антител. Сыворотки анти-HLA получают из крови людей, перенесших многократные переливания крови, трансплантацию, а также от добровольцев после соответствующей иммунизации (введение различных доз лейкоцитов или трансплантация кожных лоскутов). К настоящему времени наиболее распространено получение таких сывороток из крови женщин, много раз перенесших беременность.

Процесс приготовления сывороток сложный, трудоемкий, требует дорогостоящей аппаратуры и оборудования. У рожениц (по добровольному согласию женщины и показанию врача) берут около 10 мл крови и смешивают ее с лимфоцитами примерно 30 постоянных доноров, по возможности с полным набором HLA-антигенов. При положительном результате реакции забор крови у соответствующих рожениц повторяют, но уже в количестве более 100 мл. Из крови получают сыворотку, которую замораживают и сохраняют при —40 °С. После этого сыворотки исследуют с лимфоцитами 100—120 постоянных доноров с заранее известными антигенами. Результаты обрабатывают на ЭВМ по специальной программе, сыворотки группируют по специфичности. В дальнейшем эти сыворотки проверяют в других лабораториях, занимающихся исследованием HLA-антигенов, после чего сыворотки можно использовать для типизации. Определение HLA без учета расположения генов на хромосоме называется тканевым типированием. Установленный фенотип изображают символом локуса А-системы, после него справа указывают определенные антигены, разделенные запятой (например, HLA-A1, HLA-B8,15). Сначала перечисляют антигены локуса А, затем В. Антигены локуса А и В разделяют точкой с запятой. Генотип HLA определяют при обследовании семей и записывают его как гаплотип (например, HLA-A1, B8/A2, B12). В основе определения HLA-антигенов лежит серологическая реакция, происходящая между антигеном, в качестве которого мо-

гут быть лейкоциты, лимфоциты или тромбоциты, и антителом — сывороткой анти-HLA.

Существуют три основные методики типирования: реакция лейкоагглютинации, лимфоцитотоксический тест и реакция связывания комплемента.

Реакция лейкоагглютинации основана на свойстве лейкоцитов агглютинироваться при воздействии соответствующих сывороток анти-HLA. Исследуемую кровь смешивают с раствором Na_2ЭДТА, затем эритроциты осаждают с помощью высокомолекулярных соединений (плазмогеля, 10% раствора желатина и др.); $^2/_3$ надосадочной жидкости, в которой содержатся лейкоциты, тромбоциты с примесью эритроцитов, отсасывают. Затем при фракционном центрифугировании получают осадок лейкоцитов и тромбоцитов. После первого центрифугирования в осадке содержатся лейкоциты с примесью эритроцитов, надосадочной жидкости, тромбоциты. Освобождаясь от примеси эритроцитов, получают лейкоциты, затем доводят количество лейкоцитов до 10 000 в 1 мкл, смешивают их с соответствующими сыворотками анти-HLA, выдерживают при 37° С в течение 90—120 мин, добавляют 6% уксусную кислоту, опять смешивают и по степени агглютинации лейкоцитов учитывают результаты. Наибольшее распространение получила микромодификация реакции.

Сущность лимфотоксической реакции заключается в том, что под воздействием сыворотки анти-HLA «гибнут» лимфоциты, содержащие антигенные детерминанты. Используют наиболее чистую взвесь лимфоцитов, полученных из гепаринизированной или дефибринированной крови. Из исследуемой крови осаждают эритроциты (см. выше). После осаждения эритроцитов и получения лейкоцитарной взвеси отделяют лимфоциты от гранулоцитов фильтрацией через слой нейлоновой ваты, полиакрильное волокно, стеклянную вату и др. Лимфоцитарную взвесь можно получить с помощью карбонильного железа [Dausset J., 1968] или фиколизопакового градиента. Получают взвесь при центрифугировании в определенных режимах и гемолизе оставшихся эритроцитов. Выделенные лимфоциты под действием соответствующих сывороток анти-HLA в присутствии комплемента (кролика или морской свинки) «гибнут», окрашиваются красителем (трепановым синим или водорастворимым эозином, который проникает через поврежденную мембрану клеток) и хорошо видны под микроскопом. По количеству «убитых» лимфоцитов оценивают реакцию: до 25% окрашенных клеток — один плюс, 25%—50% — два плюса, до 75% — три плюса, более 75% — четыре плюса.

В настоящее время наиболее распространена микролимфотоксическая реакция P. Terasaki в модификации J. Dausset. Для этого 15 мл крови помещают в 100 миллиметровую колбу Эрленмейера, в которой находится не менее 15 стеклянных бусинок, колбу вращают в течение 10 мин. Затем к 10 мл дефибринированной крови добавляют 5 мл 10% раствора желатина, подогретого до 37 °С, и тщательно перемешивают, пробирку помещают под углом 45° в термостат (37 °С) на 20 мин, а затем вертикально на 10 мин, после чего отсасывают $^2/_3$ надосадочной жидкости. Полученную надосадочную жидкость фильтруют через колонку с нейлоновой ватой. Фильтр центрифугируют при 225 *g* в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливают, а к осадку добавляют 1 мл раствора Хенкса, затем центрифугируют при 108 *g* в течение 8 мин. Надосадоч-

ную жидкость сливают, к осадку добавляют 5 капель раствора Хенкса и подсчитываются лимфоциты — до 1500 в 1 мкл. В подготовленную лимфоцитную взвесь закапывают по 2 мкл сыворотки анти-HLA и помещают (в планшетах Терасаки) в термостат (37° С) на 30 мин. Затем в каждую лунку добавляют по 5 мкл комплемента, планшеты вновь помещают в термостат на 60 мин. После этого планшеты встряхивают, добавляют 1 мкл раствора 0,2% трипанового синего, смешанного с 4,25% раствором NaCl в соотношении 4:1, планшет опять помещают в термостат на 15 мин, затем оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

Реакция связывания комплемента на тромбоцитах впервые предложена J. Shulman (1962). При взаимодействии тромбоцитов и соответствующих сывороток (при наличии HLA-антигенов) фиксируется комплемент, вследствие чего уменьшается гемолиз бараньих эритроцитов, сенсибилизированных гемолитической сывороткой. По степени уменьшения гемолиза определяют наличие того или иного HLA-антигена. Реакция является самой сложной, на ее проведение требуется очень много времени.

По данным литературы, HLA-антигены с различной частотой распространены практически во всех популяциях. Для европеоидной популяции характерна высокая частота генов, детерминирующих антигены HLA A1, A2, A3, AW24, A10, B12, B7, B8 и BW35. Наиболее часто встречаются гаплотипы A2, B12; A1, B8; A3, B17; A3, BW35 и др. Для представителей монголоидной популяции (японской, китайской, сибирской) типична низкая частота антигенов HLA A1, A2, A3, высокая частота HLA A9, A11, BW35, B40; часто встречаемые гаплотипы, свойственные этой популяции: HLA A9, B5; A9 и A2, B40. Африканская популяция характеризуется высокой частотой генов, детерминирующих антигены HLA AW 30, B17, B40, и низкой частотой — A1, A11. С наиболее высокой частотой среди представителей этой популяции встречаются антигенные сочетания AW 23, B17; A3, B40; AW 30, B12 и др. Таким образом, африканской и монголоидной популяциям присуща низкая частота гена, детерминирующего антиген A1, в европеоидной популяции этот антиген, наоборот, может быть роковым маркером. Следовательно, система HLA может стать весьма перспективной при проведении экспертиз спорного происхождения детей.

В зарубежной литературе имеются указания на возможность использования системы HLA в таких экспертизах [Mayr W., 1971, 1972; Slepicka L., Bartova A., 1973; Mayr W. R. et al., 1974; Gavioli A., Tonon E., 1974; Polesky M., 1975, и др.]. Полученные данные свидетельствуют о том, что в экспертизах спорного отцовства си-

стема HLA действительно является наиболее эффективной из всех известных в настоящее время эритроцитарных, сывороточных и ферментных систем крови. Так, использование в экспертизах спорного отцовства систем ABO, MNSs, P, Kk, Rh (C, cC^w, D, e, K (a, b), Le (a, b), xg (a), EP, PEM, AK, ADA, Hp, Gc, Gm, (a, x), Inv(1) и Se позволяет исключить ложно указанное отцовство в 94%, а по одной лишь системе HLA с набором сывороток анти-HLA к 26 антигенам — в 90%, применение всех известных систем крови вместе — в 99,4% случаев [Mayr W. R., 1972]. L. Slepicka и A. Bartova (1973) на основании таблиц Хуммеля создали математическую модель, позволяющую исключить ложно указанное отцовство в 98,5% случаев.

Анализируя генетическое обоснование правил наследования системы HLA, W. R. Mayr (1972) и W. R. Mayr и соавт. (1974) разработали основные положения, которыми следует руководствоваться при исключении отцовства по системе HLA.

1. При наличии у ребенка хотя бы одного HLA-антигена, отсутствующего как у матери, так и у предполагаемого отца, вероятность исключения составляет около 80%.
2. Если ребенок не обладает ни одним из признаков локуса, которые имеет отец, то вероятность исключения будет около 10%.
3. Когда ребенок обладает гаплотипом, отсутствующим у предполагаемого отца, процент исключения невысок. Такая ситуация является наиболее сложной.

W. R. Mayr и соавт. (1974) приводят методику расчета вероятности отцовства по системе HLA, основанную, как и при использовании других систем крови, на применении математического метода Эссен-Мюллера и таблицы Хуммеля (1971, 1974). Расчеты эти чрезвычайно сложны, требуют обработки материала в крупных вычислительных центрах и нуждаются в дальнейшем совершенствовании в связи с накоплением новых данных о системе HLA. Авторы предложили теоретическую модель для расчета вероятности исключения отцовства по двум локусам системы HLA при помощи ЭВМ. Модель включает 16 различных вариантов. Однако применение этих расчетов ограничивается небольшим числом наблюдений.

Все исследователи отмечают, что давать заключения в экспертизах спорного отцовства нужно очень осторожно, особенно при исключениях. В сомнительных случаях ре-

комендуется прибегать к повторным исследованиям. В отечественной литературе в последние годы появились отдельные работы, посвященные использованию системы HLA в экспертизах спорного отцовства. В 1978 г. была защищена первая диссертационная работа, посвященная этой проблеме (Г. Ф. Кривда «Популяционно-генетическое изучение системы лейкоцитарных антигенов человека (HLA) среди населения юга Украины и применение ее в практике судебной медицины»). Г. Ф. Кривда впервые в нашей стране применил систему HLA в 65 экспертизах спорного отцовства (параллельно с использованием систем AB0, MN, P, Rh, Hp). В 8 случаях удалось исключить ложно указанное отцовство, причем в 4 случаях — только по системе HLA. Анализ экспертиз подтвердил наследование HLA-антигенов по гаплотипам. Каких-либо отклонений от правил наследования этих антигенов в парах мать — ребенок обнаружено не было. Авторы использовали основные критерии исключения ложно указанного отцовства:

а) обязательность наследования ребенком HLA-антигенов от его родителей;

б) появление в фенотипе ребенка HLA-антигенов, не имеющихся у родителей, служит основанием для исключения, при этом исключение отцовства проводилось как по одному антигену локуса, так и по обоим антигенам;

в) обнаружение у ребенка гаплотипа, отсутствующего у предполагаемого отца. Для такого варианта исключения необходимы информация о частоте встречаемости гаплотипов HLA в популяции, а также обследование близких родственников предполагаемого отца. Применение расширенного семейного анализа по гаплотипам позволяет повышать процент исключения ложно указанного отца. Поэтому в отдельных случаях, когда отцовство не исключается по системе HLA, необходимо информировать судебные органы о целесообразности исследования крови близких родственников предполагаемого отца для выяснения его гаплотипа и окончательного вывода экспертизы.

Итак, система HLA вполне пригодна для экспертиз спорного отцовства и по сравнению с системами AB0, MN, P, Rh и Hp значительно повышает процент исключения ложно указанного отцовства.

Как уже отмечалось, ребенок наследует HLA-антигены от родителей по гаплотипам. Поэтому в случае обнаружения у ребенка гаплотипа, отсутствующего у предполагаемого отца, отцовство также исключается. Такая ситуация при проведении экспертиз спорного отцовства наиболее трудна, и не всегда удается исключить отцовство на основании гаплотипов HLA. Объясняется это тем, что отцовство исключается после точного определения гаплотипа предполагаемого отца, иногда и матери. Это возможно лишь при обследовании их родителей, а при наличии рекомбинации — при расширенном обследовании близких родственников, включая братьев и сестер. Например, если у матери выявлены HLA-антигены A2, W23; B5, 12; у отца — A11; B7, 12 и ребенка — A2; B5, 12, то однозначный вывод по результатам исследования системы HLA сделать нельзя. Так, если допустить, что ребенок унаследовал от матери HLA-антигены A2, B5, а от отца B12, то отцовство не исключается. Если же предположить, что ребенок мог унаследовать антигены A2, B12 от матери, тогда отцовство исключается. Окончательный вывод возможен только после выявления гаплотипов ответчика или матери. В подобных случаях установление гаплотипа может внести определенную ясность и окончательно решить этот вопрос. В связи с этим Г. Ф. Кривда рекомендует устанавливать гаплотип предполагаемого отца во всех случаях, когда отцовство не исключается по системе HLA, по следующей схеме.

На первом этапе определяют фенотип матери предполагаемого отца (если матери нет — то отца). При обнаружении общих HLA-антигенов путем исключения устанавливают гаплотип матери предполагаемого отца и ребенка; если отцовство не исключается, гаплотипы должны совпадать. В таких случаях в заключении следует писать: «отцовство возможно с большой вероятностью». Это важно, особенно когда у обследуемых лиц оказываются редкие гаплотипы HLA и проведен популяционно-генетический анализ. На втором этапе, когда антигены бабушки предполагаемого отца и ребенка не совпадают, что возможно при рекомбинации, или если отцовство исключается, обязательно типируются антигены дедушки и хотя бы двоих его детей. В результате такого исследования выясняют, была ли рекомбинация. Если она была, то отцовство не исключается, если не была, отцовство исключается.

Раздел V

ГРУППЫ КРОВИ И ГЕМОТРАНСФУЗИЯ

Широкое распространение переливаний крови, особенно массивных, привело к тому, что клиницисты, а затем и судебные медики обратили внимание на влияние групповых факторов донора на изосерологические свойства крови реципиента [Чарный В. И., 1954; Бронникова М. А., 1968; Умнова М. А. и др., 1969; Шаболтанова Д. Г., 1973; Doichinova N., Kourteva B., 1969, и др.].

В отечественной и зарубежной литературе приводятся многочисленные данные о том, когда у реципиентов, получивших массивное переливание крови, в результате «маскировки» их истинных фенотипов различных эритроцитарных, сывороточных и ферментных систем была неправильно определена групповая принадлежность крови. Это искажало результаты экспертизы и могло быть причиной ошибочных выводов. Так, М. А. Бронникова (1968), Н. А. Разина и М. Н. Дубравская (1971) приводят два случая ошибочного исключения отцовства по группам системы MN, когда у матери и предполагаемого отца ребенка был определен тип M, а у ребенка — тип MN. Незадолго до проведения экспертизы детям в обоих случаях неоднократно переливали кровь. При повторном исследовании крови этих детей через 5 мес антиген N обнаружен не был. E. Klein и соавт. (1976) описали случай, когда у ответчика в результате предшествующего переливания крови неправильно были определены фенотипы $ФГМ_1$ и ГПАТ, а J. Suyama и соавт. (1976) сообщили об искажении истинных фенотипов систем MN и ФГМ ребенка, подвергшегося обменному переливанию крови в родильном доме. А. С. Гладких (1971) наблюдал случай, когда мать и предполагаемый отец имели фенотип C_5^-, а ребенок — C_5^+. Однако мать сообщила, что ребенок родился недоношенным и ему в родильном доме переливали кровь и плазму от 8 разных доноров. При повторном исследовании через 2 мес компонент C_5 в сыворотке крови

ребенка был слабовыраженным, а спустя еще 3 мес он уже не выявлялся. Был сделан вывод о том, что этот компонент ребенок получил от донора.

Е. Ф. Зарецкая (1973) на большом клиническом материале изучала длительность «маскировки» истинного фенотипа реципиента по изосерологическим и сывороточным системам АВО (Н), Rh, MN, P, Hp, Gm, холинэстеразы (локуса E_2) соответствующими эритроцитарными и сывороточными антигенами донора, а также зависимость между длительностью «маскировки» и объемом перелитой крови или плазмы.

Исследовали кровь детей с гемолитической болезнью новорожденных, обусловленной конфликтом плода и матери по системам АВО (Н), Rh и сочетанной несовместимостью (в связи с этим проводили заменные переливания крови), а также кровь больных детей, получивших однократные и многократные переливания небольших количеств крови и плазмы. Для наблюдения отбирали только тех детей, которые в результате переливания крови или плазмы получили несвойственные им эритроцитарные или сывороточные антигены. Исследование крови проводили ежемесячно в течение 1—8 мес в зависимости от полученных результатов.

Полученные автором данные свидетельствуют о том, что по системе АВО(Н), групповые антигены которой онтогенетически формируются очень рано (с 5-й недели внутриутробной жизни) и к моменту рождения уже хорошо выражены [Бронникова М. А. и др., 1962, 1963], «маскировка» истинного фенотипа реципиента под воздействием антигенов донора наступает при переливании лишь больших количеств крови и продолжается недолго (10—14 дней после массивного переливания крови). Поскольку такая «маскировка» ограничена несколькими днями, она, по-видимому, не представляет большой опасности для экспертиз спорного отцовства, однако эксперты в подобных случаях должны быть осведомлены о перенесенных гемотрансфузиях (особенно если это касается ребенка).

По системе Rh картина «маскировки» ее фенотипов другая. Поскольку Rh-положительные эритроциты разрушаются быстрее, чем Rh-отрицательные, для заменных переливаний крови при гемолитической болезни новорожденных ребенку, как правило, переливают Rh-отрицательную кровь [Mollison P., 1943]. Е. Ф. Зарецкая установила, что у большинства Rh-положительных детей (29 из 45) отрицательная реакция сохранялась в течение месяца

после гемотрансфузии. Лишь у 9 детей антиген D был выявлен через 3 мес после переливания крови. Последнее можно объяснить, видимо, тем, что количество перелитой крови в этих случаях составляло 85,9 — 95,8% от объема крови и антиген D оставшихся эритроцитов мог быть блокирован материнскими антителами анти-D. В 10 других случаях при таком же количестве перелитой крови антиген D обнаруживался уже на 1—2-месяце после переливания крови и, вероятно, начальный титр антител анти-D был ниже. Показано, что антигены C и E могут выявляться в крови реципиентов, получивших эти антигены при заменных переливаниях Rh-положительной крови, в течение 2—4 мес. Приведенные данные следует учитывать при проведении массивных переливаний крови.

При определении длительности «маскировки» фенотипа реципиента по системам MN, P соответствующими антигенами донора также показана ее зависимость от количества перелитой крови (обследование детей, получивших при переливаниях несвойственные им антигены MN, P). Установлено, что антигены M и N доноров «маскируют» фенотип реципиента в течение 10 сут — 4 мес. При исследовании крови детей группы P—, получивших при заменных гемотрансфузиях кровь группы P+, выявлена такая же зависимость; антиген донора в крови реципиентов сохранялся в течение 10 сут — 4 мес.

В крови реципиентов, имевших группу крови Gm(—1) и при заменном переливании получивших с кровью или плазмой донора антиген Gm(1), последний сохранялся от 10—12 дней до 4—5 мес в зависимости от количества перелитой крови или плазмы. Время обнаружения донорского Hp в крови ограничена временем жизни его молекулы, которое относительно невелико, поэтому по мере увеличения срока с момента переливания возможность выявления Hp донора в сыворотке крови реципиента будет уменьшаться. По данным Е. Ф. Зарецкой, после обменных трансфузий донорская группа Hp у новорожденных детей «маскирует» истинный фенотип реципиента на очень короткое время — 1—3 дня, что обусловлено, очевидно, интенсивным обменом Hp. Однократные, а также многократные гемотрансфузии не искажают группу Hp детей. Длительность «маскировки» фенотипа холинэстеразы C_5^- — 10 сут — 5 мес, и зависит от количества перелитой крови или плазмы. Довольно продолжительное сохранение донорской холинэстеразы в крови детей с ге-

молитической болезнью новорожденных можно объяснить, по-видимому, тем, что сывороточная холинэстераза относится к белкам и синтезируется главным образом в печени, функция которой у таких детей снижена [Таболин В. А., Вельтищев Ю. Е., 1964]. Зависимость длительности нахождения донорского фермента от состояния здоровья детей при рождении и в последующем не наблюдалась.

Итак, полученные результаты позволяют более правильно подойти к оценке данных исследования крови лиц, проходящих по делам о спорном происхождении детей.

Раздел VI

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ СИСТЕМ КРОВИ

Как уже отмечалось, судебно-медицинская экспертиза спорного происхождения детей в настоящее время является экспертизой исключения, позволяющей только исключить происхождение ребенка от конкретной родительской пары. Вероятность такого исключения зависит от количества исследованных групповых антигенов крови у всех проходящих по делу лиц. Доказательное установление отцовства по групповым факторам крови практически пока невозможно, за исключением крайне редких случаев.

При современном уровне развития серологии теоретически мы располагаем стопроцентной возможностью исключения отцовства любого мужчины, не являющегося биологическим отцом конкретного ребенка. Однако на практике такая возможность ограничена, поскольку даже в самых крупных судебно-медицинских лабораториях групповую характеристику крови типизируют далеко не по всем известным эритроцитарным, сывороточным и ферментным системам, обладающим генетически обусловленным полиморфизмом. Во многих странах (ПНР, ГДР, ФРГ, Австрия и др.) прибегают к математическому вычислению вероятности отцовства. Существуют биостатистические методы, основанные на частоте встречаемости тех или иных признаков в двух и более аллельных системах крови для определенной популяции. Правомочность такого подхода для косвенного доказательства отцовства не бесспорна.

Известнейший серолог O. Prokop при решении вопроса о целесообразности использования той или иной генетически детерминированной системы крови человека в судебно-медицинских экспертизах предлагает руководствоваться следующим. Во-первых, генетически детерминированный порядок наследования антигенов системы крови должен быть четким и постоянным, что нужно тщательно

проверять на обширном мировом семейном материале, исследованием так называемых «критических» пар мать — ребенок и близнецов. Во-вторых, групповые антигены этой системы, определяющие тот или иной ее фенотип, должны быть онтогенетически полностью сформированы к моменту рождения ребенка, поскольку большинство экспертиз проводятся при ранних сроках жизни ребенка. В-третьих, генетические системы, используемые в таких экспертизах, должны быть достаточно полиморфными и иметь благоприятную для исключения отцовства частоту встречаемости групповых антигенов среди определенной популяции. В-четвертых, методики определения фенотипов этих систем должны отвечать всем требованиям, предъявляемым к методам и реакциям, используемым в судебно-медицинской экспертной практике.

Экспертиза спорного отцовства может быть осуществлена на нескольких уровнях: по отдельным признакам (антигенам) групповых систем (первый, или низший, уровень), по фенотипам неполным или полным (второй, или средний, уровень), по гаплотипам и генотипам групповых систем (третий, или высший, уровень). Исследование по фенотипам должно обязательно предшествовать исследованию на уровне гаплотипов и генотипов групповых систем, последние же обеспечивают наибольшую эффективность экспертизы спорного отцовства. На практике часть экспертиз выполняется на смешанных уровнях, включая и первый. Дополнительным направлением в исследованиях при экспертизе спорного отцовства, перспективным, но недостаточно проверенным, можно считать определение полиморфизма некоторых хромосом по гетерохроматину.

В большинстве случаев проводимые в нашей стране экспертные исследования сводятся к выявлению в крови у матери, ребенка и предполагаемого отца групповых антигенов, определяющих тот или иной фенотип. Иногда по фенотипу групп крови нельзя исключить отцовства, так как часто фенотип не отражает генотипические комбинации, по которым и судят о возможности рождения ребенка от конкретной родительской пары. В таких случаях необходимо выяснить генотип матери и предполагаемого отца, для чего следует исследовать группы крови их родителей, а также братьев и сестер ребенка, происхождение которого устанавливается. Практическое применение научных данных о генных комплексах и гаплотипах —

качественено важный этап развития экспертизы спорного отцовства. Использование их в этой экспертизе является оправданным, необходимым и поэтому неизбежным.

Подобное расширенное исследование позволяет установить тот комплекс антигенов разных систем, который ребенок мог получить от отца или матери. Более того, анализируя кровь родителей отца и матери ребенка, можно установить, какой генный комплекс они передают по наследству, и исходя из этого решать, мог ли ребенок получить имеющийся у него комплекс от того или иного родителя. По данным O. Prokop и W. Dürwald (1958), O. Prokop и W. Göhler (1976), такие исследования примерно в 50% случаев дают возможность получить дополнительные сведения о происхождении ребенка. По нашему мнению, это является обязательным условием при проведении судебно-медицинских экспертиз применительно к большинству изосерологических, сывороточных, ферментных и лейкоцитарных систем крови.

Общие принципы экспертизы спорного отцовства на основе изучения гаплотипов и генотипов сводятся к следующему. Известный генотип хотя бы у одного из 3 лиц (ребенка, матери или ответчика) является в некоторых случаях необходимым условием для исключения отцовства. Такое исключение иногда можно сделать, не зная истинный генотип ответчика, но учитывая его возможные варианты. Если ребенок гомозиготен, нет необходимости определять генотип его матери, а если гетерозиготен, то должен быть выяснен генотип (или возможные генотипы) его матери или ответчика или генотипы их обоих.

Генотип ребенка выявляют через генотип матери, за исключением тех случаев, когда его генотип может быть выведен непосредственно из группы крови (фенотипа). Иногда это позволяет определить генотип матери. Например, если группа крови ребенка MS, а матери MNSs, то ясно, что мать имеет генотип *MS/Ns*, а не *Ms/NS*. При известном генотипе матери и полном фенотипе ребенка генотип последнего не всегда можно установить даже по системам, гены которых кодоминантны (при наличии трех и более генов на каждой хромосоме). Это ограничивает число возможных генотипов ребенка. Далеко не всегда знание генотипа матери необходимо для определения генотипа ребенка. Более того, иногда достаточно только данных о группе крови матери, чтобы установить генотип ребенка, в то время как ее собственный генотип

остается неизвестным. Такие благоприятные сочетания признаков матери и ребенка ускоряют проведение экспертизы.

Судебно-медицинская экспертиза спорного отцовства, при которой определяют генотип, связана с необходимостью определять круг лиц, состоящих в родственных отношениях с ответчиком или истцом, знание о групповых признаках которых может способствовать выяснению генотипов ответчика (это нужно знать всегда) и истца (это нужно знать в некоторых случаях). Первостепенное значение для экспертизы имеют лица по прямой восходящей и нисходящей линиям родства, а также родственники, состоящие с ответчиком или истцом в близком полнородном родстве по боковой линии. Более отдаленное родство, в частности неполнородное, реже представляет экспертный интерес.

Возможности экспертизы спорного отцовства, проводимой на уровне гаплотипов и генотипов, покажем на примерах систем MNSs, Rh, Gm.

Эритроцитарная система MNSs имеет 4 гаплотипа, 9 фенотипов и 10 генотипов. Гаплотипы кодоминантны и при 8 группах крови генотипы устанавливают непосредственно на основе фенотипа. Только при наличии группы MNSs генотип остается неизвестным, что требует проведения дополнительных исследований.

Так, в одной экспертизе спорного отцовства мать и ребенок имели группу крови Ms, а ответчик — группу MNSs. Если бы экспертизу проводили на уровне фенотипов, то констатировали бы неисключение отцовства по этой системе. Однако исследование проводили на уровне генотипов, что и позволило произвести исключение. В то время как генотип ребенка был известен (*Ms/Ms*) [1], генотип ответчика мог быть либо *Ms/NS*, либо *MS/Ns*. Отцовство мужчины с первым генотипом не исключалось, а мужчина со вторым генотипом не мог быть отцом данного ребенка, так как не имел гаплотип Ms. Мать ответчика принадлежала к группе Ns и генотипу *Ns/Ns*. Она могла передать своему сыну только гаплотип Ns, поэтому его генотип был *MS/Ns* и он не мог стать отцом ребенка с генотипом *Ms/Ms*.

---

[1] Генотип матери был таким же, но это не имело значения, поскольку ребенок был гомозиготен.

Приведем случай спорного отцовства, когда родителей ответчика не было в живых. Ребенок имел группу крови Ms (генотип *Ms/Ms*), ответчик — группу MNSs, брат ответчика — группу MS (генотип *MS/MS*). Реконструирование генотипов умерших родителей ответчика позволяло заключить, что у них был гаплотип MS. Это не исключало предположения о наличии хотя бы у одного из них гаплотипа Ms. По-видимому, эта экспертиза осталась бы нерезультативной, если бы по этому делу не проходила полнородная сестра ответчика (установлено по свидетельству о рождении). Ее группа крови оказалась не столь уж редкой Ns (15%), стали ясными генотипы умерших родителей ответчика (*MS/Ns*). Ответчик не имел гаплотип Ms и это исключало его отцовство.

Система Rh. Группа крови матери была DCce, ребенка — ce, ответчика — DCEce. Группе крови матери соответствовали три генотипа: *DCe/dce, DCe/DCe, dCe/Dce.* При единственно возможном генотипе *dce/dce* ребенка генный комплекс *dce* должен быть у матери, генотип которой поэтому легко устанавливался. Такой же комплекс должен иметь и биологический отец[1]. Антигенному сочетанию DCEce у ответчика соответствовало 6 возможных генотипов. У отца ответчика оказалась группа крови DCce, а у матери — DEce. Возможные генотипы отца и матери ответчика и частота их встречаемости (в скобках, %) следующие

Отец	*Мать*
DCe/dce (32,68)	*DcE/dce* (10,96)
DCe/Dce (2,15)	*DcE/Dce* (0,72)
Dce/dCe (0,05)	*Dce/dcE* (0,06)

На основании формального анализа этих данных можно предположить, что генотип отца ответчика *DCe/dce*, матери *dcE/dce* и хромосома *dce* могли быть получены ответчиком от отца или матери. Основным выводом неформального анализа явилось то, что антиген C ответчик получил от отца, а антиген E — от матери и, следовательно, гены этих антигенов не могли располагаться вместе ни на одной из его двух хромосом. Это послужило первым доказательством того, что ответчик не мог быть отцом.

---

[1] Согласно законодательству СССР, мужчина становится юридическим отцом усыновленного ребенка, не являясь его биологическим отцом.

Если бы ответчик являлся биологическим отцом данного ребенка, у него должен быть только один генотип *DCE/dce*, но именно гаплотип DCE отсутствовал, поскольку гаплотипа DCE не было ни в одном из возможных генотипов родителей. Это явилось вторым доказательством исключения отцовства ответчика. Таким образом, несмотря на исследование семьи, истинные генотипы ответчика, его отца и матери остались неизвестными, но генетический анализ по возможным генотипам позволил исключить отцовство ответчика на двух основаниях.

Гаплотипический механизм наследования факторов системы Gm перспективно использовать в решении вопросов спорного отцовства. Европеоидным популяциям свойственны гаплотипы 1; 1,2 и 4,10, монголоидным — 1; 1,2; 4,10, 1,4, 10 и 1,10. Знание этих гаплотипов и соответствующих 15 генотипов обязательно для экспертов СССР. Приведем пример.

Мать и ее сын имели одинаковый фенотип Gm(a+x—f—b+), или, по новой номенклатуре, Gm(1,—2,—4,10), ответчик — фенотип Gm(a+x+f—b—), или Gm(1,2,—4,—10). В настоящее время при оценке результатов исследования по отдельным факторам системы Gm или даже фенотипам этой системы экспертное заключение применительно к этому примеру будет однозначным: отцовство ответчика по факторам или фенотипам системы Gm исключаться не может; ответчик и ребенок имеют фактор Gm(a) и не имеют фактора Gm(f), ответчик имеет фактор Gm(x), отсутствующий у матери ребенка, а фактора Gm(b) нет у ответчика, но он имеется у матери и ребенка. Принимая же во внимание гаплотипический порядок наследования аллелей системы Gm, генетически реализующих появление тех или иных ее факторов, можно прийти к выводу, что фенотипу Gm ребенка и его матери соответствуют две возможные генотипические комбинации: *1/1,10* или *1,10/1,10*. Фенотипу Gm ответчика также могут соответствовать два возможных генотипа *1,/1,2* или *1,2/1,2*. В данном случае эксперту важно знать истинные генотипы ответчика, матери и ребенка, поскольку при генотипе *1/1,2* у ответчика и *1/1,10* у ребенка и его матери отцовство не исключается, а при генотипе ответчика *1,2/1,2*, ребенка *1/1,10* и его матери *1,10/1,10* ответчик, естественно, не может являться отцом данного ребенка. Исследование крови родителей матери ребенка и ответчика показало, что у всех них имеется фе-

нотип Gm(a+x+f—b+), или Gm(1,2,—4,10), с единственно возможной генетической комбинацией *1,2/1,10*. Этим определялся истинный генотип матери ребенка и ответчика, который соответственно мог быть только *1,10/1,10* и *1,2/1,2*. Такое расширенное семейное обследование позволило эксперту исключить отцовство ответчика, даже не выяснив его истинный генотип, который мог быть либо *1/1,10*, либо *1,10/1,10*. В любом случае генотипически гомозиготная мать ребенка (*1,10/1,10*) могла передать ребенку только генный комплекс *1,10*, а другой генный комплекс *1* или *1,10* ребенок мог унаследовать от отца. Ответчик же, имеющий гомозиготный генотип *1,2/1,2*, не имеет этих гаплотипов, следовательно, он не является отцом ребенка.

Использование данных о гаплотипах и генотипах требует предварительного генетического анализа соотношения групп крови по каждой системе, установленных у ребенка, матери и ответчика, для исключения бесперспективных для экспертизы групповых систем. Приведем некоторые примеры. 1. Выявление генотипа ответчика оправдано, если при группе крови матери 0, ребенка A_2 группа крови ответчика A_1, но не A_2. 2. Группа крови матери MS, ребенка и ответчика — MNSs. Установление генотипа ответчика обосновано. Однако если у матери есть еще и антиген s, то дальнейшее исследование бесперспективно, хотя в обоих случаях генотип матери известен. 3. Группа крови матери cE, ребенка и ответчика — DcE. Единственно возможный генотип матери *dcE/dce* позволяет установить, что генотип ребенка *DcE/dce* и хромосома *DcE* получены от отца. Однако определять генотип ответчика не имеет смысла, так как комплекс *DcE* содержится при каждом генотипе из двух возможных (*DcE/DcE, DcE/dcE*). 4. Аллотип матери (*1,2—4,10*), ответчика (*1,—2,—4,10*), генотип ребенка *1,2/1,10*. Ясно, что гаплотип 1,2 получен от матери, хотя ее генотип остался невыявленным (*1,2/1,2* или *1/1,2*). Гаплотип 1,10 получен от отца, но он есть при обоих возможных генотипах ответчика (*1/1,10* или *1,10/1,10*), что не позволяет в данном случае использовать эту систему для исключения отцовства по генотипам.

На основе знаний о сложнейших генетических взаимосвязях в большинстве групповых систем крови человека можно утверждать, что в крупных судебно-медицинских лабораториях и центрах, специализированно зани-

мающихся проблемами экспертизы спорного отцовства и оснащенных необходимой аппаратурой, реактивами и серологическими реагентами, а главное, имеющих в своем распоряжении высококвалифицированных специалистов, даже сейчас вполне реально исключение отцовства подавляющего большинства мужчин, не являющихся фактическими отцами ребенка, но фигурирующих в качестве ответчика. Такое исключение, естественно, возможно только при выявлении у ребенка, его матери и предполагаемого отца генных комплексов, аллельных сочетаний, гаплотипов и генотипов, обусловливающих появление большого числа групповых антигенов изосерологических, сывороточных, ферментных и лейкоцитарных систем крови человека.

Дальнейшее расширение возможностей в этой области безусловно позволит в недалеком будущем достигнуть 100% исключения отцовства мужчин, не являющихся фактическими отцами того или иного ребенка. При достижении такого уровня судебно-медицинская экспертиза спорного отцовства сама по себе перейдет от экспертизы исключения, каковой в настоящее время она и является, к качественно и принципиально новой экспертизе установления отцовства. Для того чтобы приблизить и ускорить наступление такого будущего, уже сейчас можно, по нашему мнению, наметить определенные пути и подходы к решению этой важной социальной задачи. Для подхода к решению проблемы установления фактического отца ребенка уже в настоящее время можно использовать редкие, или атипичные, аллели, генные комплексы, реализующие появление атипичных фенотипов во многих групповых системах крови. Действительно, выявление у ребенка и его предполагаемого отца атипичных аллелей, генных комплексов или гаплотипов какой-либо групповой системы крови наряду с расширенным исследованием генотипических и гаплотипических комбинаций многих других систем крови у ответчика, ребенка и матери, не исключающем возможность рождения ребенка от этой родительской пары, позволит сделать вполне аргументированное заключение о том, что ответчик скорее всего или почти наверняка является истинным отцом ребенка.

Надо помнить о том, что разработка формально-генетических моделей наследования генетических маркеров тех или иных систем основана на обширных семейных обследованиях, исследованиях групповых факторов у гомо-

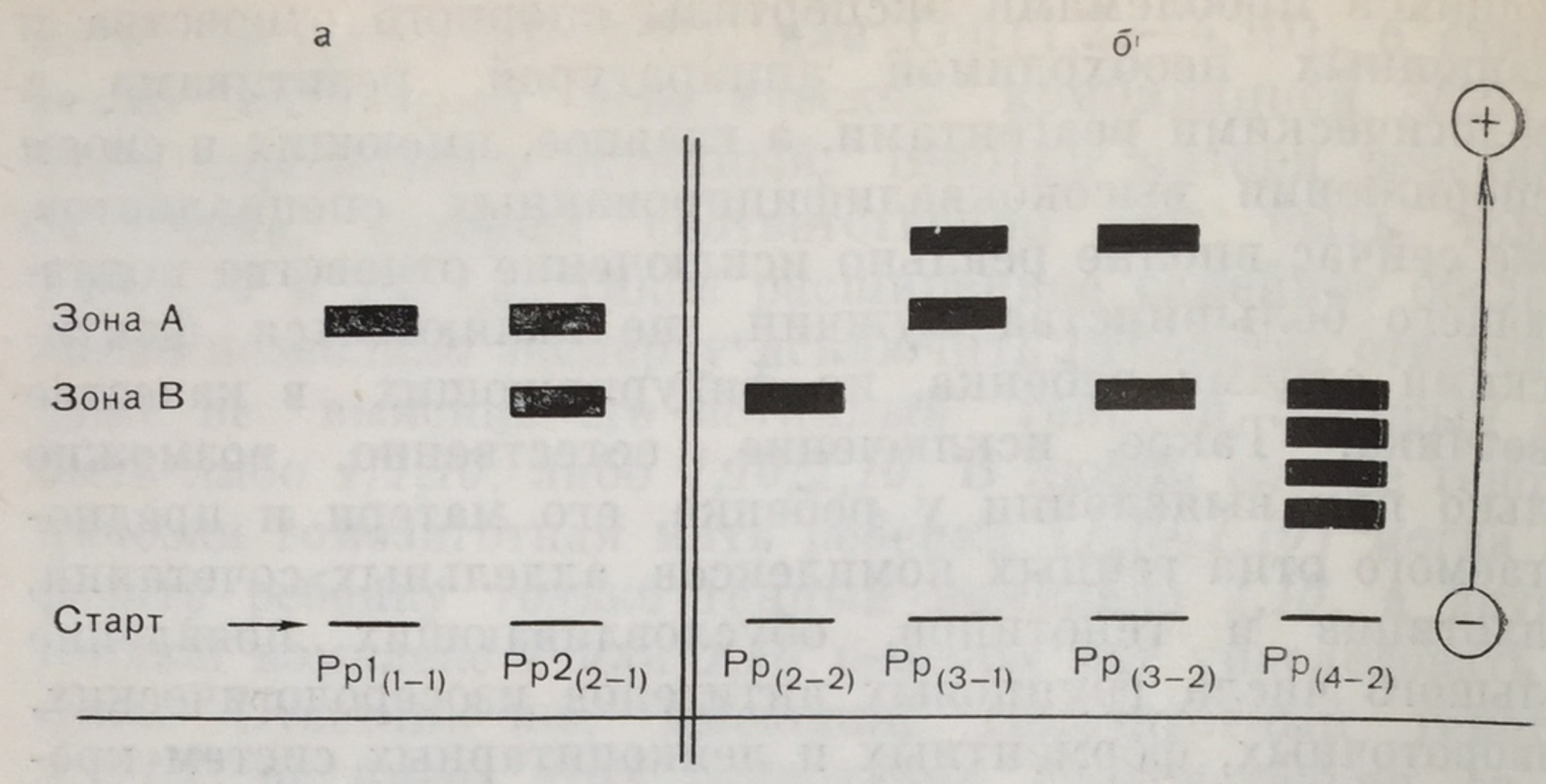


Рис. 21. Схематическое изображение двух обычных фенотипов сывороточной щелочной фосфатазы (а) и четырех ее атипичных фенотипов (б).

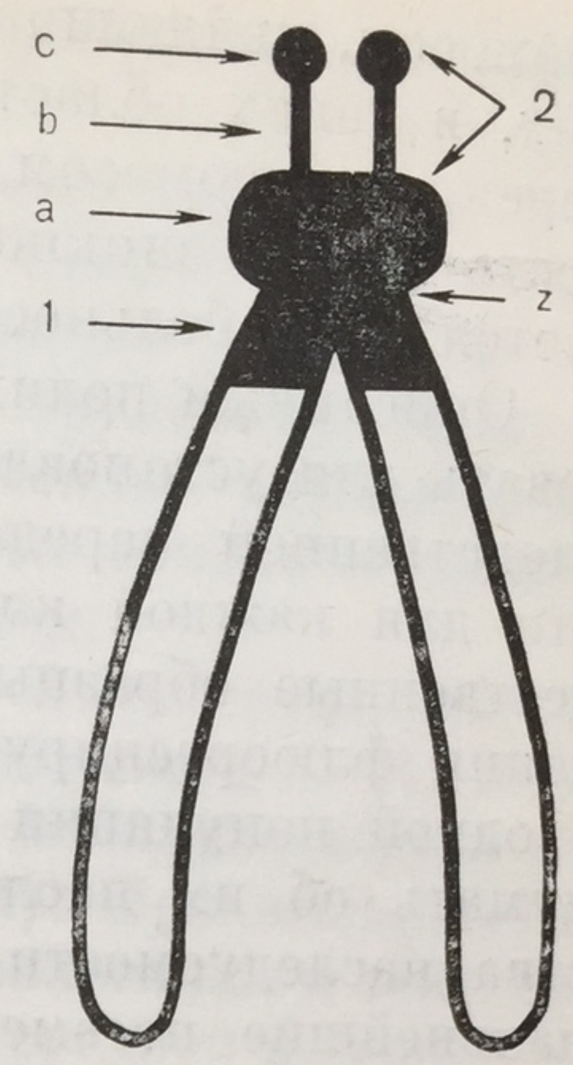
зиготных близнецов и обследованиях так называемых «критических» пар. Поэтому широкие возможности для выявления группового генетически детерминированного наследственного полиморфизма крови человека позволят эксперту в какой-то мере искусственно подбирать такие «критические» генотипические сочетания групповых систем крови у матери и ответчика, при которых (если ответчик является истинным отцом ребенка) ребенок может иметь единственно возможный фенотип. Подбор нескольких таких сочетаний у матери и предполагаемого отца и выявление у ребенка единственно возможных для этих генотипических сочетаний фенотипов — также вполне аргументированный и научно обоснованный подход к судебно-медицинскому экспертному установлению истинного отца ребенка.

По каждой групповой системе, в пределах известных к настоящему времени ее генов, гаплотипов и фенотипов можно определить вероятность исключения по этой системе ложно указанного отцовства [Туманов А. К., Томилин В. В., 1969]. Например, по системе АВ0 эта вероятность равна 16,8%, а по КФЭ — 24,5%. Когда суммарная вероятность исключения достигает некой величины (явно значительно больше 100%), обеспечивающей безошибочность вывода, появится обоснованная возможность для экспертной формулировки типа «отцовство ответчика определено» [1].

[1] Но и тогда будут ограничения, связанные, например, с гомозиготностью, диспермией, триплоидией, химеризмом групп крови.

Рис. 22. Схематическое изображение акроцентрических хромосом и строение их коротких плеч.

z — центромер, черным обозначены четыре вариабельные области. 1 — длинное плечо (центромерная или проксимальная часть). 2 — короткое плечо: a — проксимальная часть плеча, b — сателлитовая часть плеча, c — сателлиты.



На таком пути развития экспертизы также встретятся сложности, противоречия, невыясненные проблемы. Разрешение последних будет зависеть не только от судебных медиков, но и многих других специалистов.

До последнего времени при установлении отцовства применяли в основном описанные выше эритроцитарные, сывороточные, лейкоцитарные и ферментные системы. В последние годы рекомендуют использовать для этих целей прямое исследование хромосом. Морфология хромосом очень разнообразна, что можно использовать в экспертизах по установлению отцовства. Однако такая возможность в экспертной практике пока еще не реализована, что связано не только с трудностями исследования особенностей кариотипа человека, но и главным образом недостаточной доказанностью наследственной передачи этих особенностей.

Современные методы исследования хромосомного набора человека свидетельствуют о том, что по меньшей мере 10 из 23 пар хромосом обладают вариабельностью [Schnedl J., 1973]: №№ 1, 3, 4, 9, 13, 14, 15, 16, 20, 21 и Y. Наиболее показательна вариабельность удлинения. Наиболее частая и выраженная вариабельность в центрометрической позиции длинного плеча проявляется в хромосоме № 3 [Schnedl J., 1971]. Этот признак может быть как в гомозиготной, так и гетерозиготной форме. То же наблюдается и в хромосоме № 4. Вариабельность наблюдается в больших и малых акроцентрических хромосомах (№№ 13—15 и №№ 21—22) (рис. 22). Очень часто эти хромосомы характеризуются интенсивной флюоресценцией в центромерах и особенно в области короткого плеча [Caspersson L. et al., 1970].

Такая вариабельность хромосом человека интересна как с теоретической, так и с практической точки зрения. Во-первых, полиморфизмом могут обладать лишь участки

хромосом, являющиеся генетически неактивными. Во-вторых, в таких областях, хотя и очень редко, может быть перекрест хромосом, вследствие чего появляется возможность для возникновения вариабельности. Этим достигается вариабельность определенного участка хромосомы.

Описанный полиморфизм в хромосомах можно использовать для установления отцовства лишь при условии наследственной передачи такого полиморфизма. Показано, что для каждой клетки индивидуума характерны тождественные образцы хромосомной вариабельности. Появления флюоресцирующих зон на хромосомной паре № 3 в одной популяции и частота этих признаков позволяют думать об их наследственной природе. Для доказательства наследуемости полиморфизма хромосом необходимы дальнейшие посемейные исследования, результаты которых и позволят окончательно решить вопрос о возможности использования этого признака в экспертизе спорного отцовства. В случае установления наследственной передачи полиморфности хромосом их исследование будет весьма перспективным при решении вопроса о спорном происхождении ребенка. Дело в том, что исследование хромосом можно проводить непосредственно сразу после рождения «спорного» ребенка и результаты можно получить через 3—4 дня после взятия крови. Причем в одном исследовании могут быть выявлены все без исключения интересующие эксперта хромосомные признаки. Этот тест может использоваться и для установления отцовства (в тех случаях, когда по всем серологическим групповым признакам оно также не исключается).

В последние годы установлено, что групповым наследственным полиморфизмом обладает не только кровь человека, но и многие выделения и, в частности, слюна. Достоверно установлено, что все известные групповые антигены слюны человека (ABH, Le^a, Le^B, Le^c, Le^d, Sd^a) соответствуют антигенам изосерологических систем. С помощью разделительных электрофоретических и изоэлектрофокусических методов анализа удалось установить генетическую природу весьма полиморфных протеидных комплексов, присущих только только слюне человека — речь идет о так называемых собственных группах или собственных генетических системах слюны человека. К настоящему времени известно 11 систем собственных групп слюны человека, позволяющих определить в ней 39—41 группу, [Сигал Е. Р., Потапов М. И., 1977].

Учитывая доступность слюны как материала для исследования, можно смело утверждать, что уже в недалеком будущем при решении экспертных вопросов в делах о спорном отцовстве, материнстве и замене детей в качестве достоверных генетических маркеров будут учитываться не только многочисленные групповые факторы крови человека, но и групповые протеиды слюны, обладающие, как показали многочисленные семейные обследования, наследственным полиморфизмом.

Доказательства существования в слюне группового полиморфизма протеидов впервые представили C. R. Balakrishnan и G. C. Ashton (1971) на IV Международном конгрессе по генетике человека (Париж). При исследовании с помощью электрофореза в полиакриламидном геле слюны околоушной железы в зоне полос средней подвижности было выявлено 4 фенотипа. В дальнейшем авторы при посемейном обследовании показали генетическую обусловленность этого полиморфизма.

Слюна человека содержит протеиды, как обладающие серологическим родством с протеидами сывороток крови, так и не имеющие такого родства. Белков в слюне по сравнению с сывороткой крови (7—8%) весьма мало. Например, в самом богатом белками секрете околоушной железы их содержится не более 0,26%. Вот почему при поиске в слюне групповых веществ белкового происхождения приходиться концентрировать ее органические вещества в $2^1/_2$—10 раз. Неустойчивость протеидных комплексов в выделенной слюне обусловливает необходимость стабилизировать ее групповые свойства путем замораживания до —20°С, лиофилизации или добавлении к слюне некоторых ингибиторов ферментов. Эти способы консервации сохраняют групповые свойства слюны в течение 6 мес.

Во всех работах для выделения групповых компонентов из слюны применялся горизонтальный или вертикальный электрофорез в крахмальном или полиакриламидном геле. C. R. Balakrishnan и G. C. Ashton (1974) использовали буфер с pH 8,0, содержащий гидроксид лития и борную кислоту с добавлением лимонной кислоты. E. A. Azen (1972, 1973), R. D. Friedman и соавт. (1975) применяли буфер с pH 2,4, состоящий из растворов лактата алюминия и молочной кислоты. E. A. Azen и соавт. (1973, 1974) наилучшие результаты получили при использовании трис-боратного буфера с pH 8,9. Электрофорез проводили в течение 3—20 ч при напряжении 250—300 В, силе тока 15—

35 мА в условиях комнатной или пониженной до 10—15 °С температуры. По окончании электрофореза протеиды окрашивали 1% амидошварцем в 1—2% растворе уксусной кислоты.

Системы F и S. В зоне средней подвижности протеидных компонентов были обнаружены [Balakrishnan C. R., Ashton G. C., 1971, 1974] варьирующее от индивида к индивиду наличие, отсутствие или сочетание полос, быстрой F и медленной S. Эти вариации составили 4 фенотипа: FS, F, S и 0 (отсутствие полос) с частотой соответственно 50; 12; 32 и 6%. Посемейное изучение фенотипов в 116 семьях с 279 детьми позволило считать, что наследование протеидов F и S не зависит друг от друга. Генетическая гипотеза предусматривает существование двух локусов, каждый из которых имеет доминантные и рецессивные аллели. Локус Sal I имеет два гена F и f, а локус Sal II — также два гена — S и s. Синтез протеидов, характеризующих обе системы, происходит уже к моменту рождения ребенка. Связи между обоими локусами, а также каждого из них с локусом групп крови АВ0 выявлено не было. Не обнаружена связь и локуса Sal II с локусом выделительства, однако сцепление локусов Sal I и выделительства не исключается. Эти результаты однозначны и для цельной слюны, и для слюны околоушных желез.

Система Pb. С помощью электрофореза в кислом крахмальном геле выявлен [Azen E. A., 1972, 1973] комплекс щелочных протеидов, быстро движущихся к катоду. Пять протеидов системы Pb обозначают буквами a, b, c, d, e по степени убывания их подвижности. Были отмечены три варианта их сочетаний: abde, abcde и c. Результаты посемейных обследований и соответствие распределения частоты вариантов закону Харди—Вайнберга позволили обосновать гипотезу наследования протеидов системы Pb, согласно которой она имеет один локус с двумя кодоминантными аллелями Pb^1 и Pb^2. Ген Pb^1 ответствен за комплекс abde, ген Pb^2 — за c. Система Pb соответственно представлена тремя фенотипами: Pb1-1, Pb1-2, Pb2-2. Созревание системы совпадает со временем рождения ребенка. У недоношенных детей отсутствуют некоторые полосы протеидов свойственного им фенотипа. Доказательством принадлежности протеидов системы Pb к собственным группам слюны является то, что они не были найдены в крови, слезах, спинномозговой, амниотической и простатической жидкости, а также лейкоцитах человека.

Частота встречаемости аллелей Pb^1 и Pb^2 среди европеоидов, негроидов и монголоидов составляет соответственно 99,5 и 0,5%, 84 и 16%, 100 и 0%.

Система Pa [R. D. Friedman et al., 1972, 1975]. Расположение на фореграммах, по-видимому, единственного гликопротеида, составляющего эту систему, противоположна расположению протеидов системы Pb: он ближе всех к аноду. Система включает два фенотипа: Pa^+, представленный интенсивным анодным компонентом, и Pa — при отсутствии этого компонента. В слюне околоушных и подчелюстных желез система представлена в равной степени четко, исследование цельной слюны обеспечивало получение идентичных результатов лишь в 50% случаев. Посемейный анализ показал простое доминантное наследование протеида Pa. Изучение слюны, полученной в разное время дня и в разные дни от одних и тех же лиц, показало постоянство секреции протеида Pa у людей группы Pa^+ и отсутствие этого протеида у людей группы Pa^-. Частота встречаемости аллелей Pa^+ и Pa^- среди европеоидов, негроидов и монголоидов составляет соответственно 21 и 79%, 14 и 86%, 42 и 58%.

Система SalCb. Эта система единственная из известных генетических систем слюны, полиморфизм которой является серологической реакцией задержки гемагглютинации эритроцитов крови человека. Дифференцирование двух фенотипов этой системы $SalCb^+$ и $SalCb^-$ проявлялось наличием или отсутствием задержки реакции гемагглютинации цельной слюной при действии на эритроциты гемагглютинина, продуцируемого Clostridium botulinum. Лица с фенотипом $SalCb^+$ являлись выделителями задерживающей субстанции, а $SalCb^-$ были невыделителями ее. Семейный анализ свидетельствовал о наследовании по двум аллелям с обеспечением выделительства доминантным геном, причем было установлено, что задерживающая субстанция хорошо выражена ко времени рождения ребенка. Частота встречаемости аллелей $SalCb^+$ и $SalCb^-$ среди европеоидов составляет соответственно 73,3 и 26,7%.

Система Pr. При электрофорезе в щелочном полиакриламидном геле недалеко от анода между протеидом системы Pa и амилазой была выявлена полиморфная система протеидов Pr [Azen E. A. et al., 1973, 1974], характеризовавшихся как пролинобогащенные. Протеиды этой системы располагаются на 5 уровнях: x, 1, 2, 3, 4. Мини-

мальное число полос на фореграмме—2, максимальное—5. Система состоит из 10 фенотипов: 4 основных (гомозиготных) и 6 производных (гетерозиготных). Она имеет один локус с четырьмя кодоминантными аллелями: Pr^1, $Pr^{1'}$, Pr^2 и $Pr^{2'}$. Гомозиготные фенотипы системы — Pr1—1, Pr1′—1′, Pr2—2 и Pr′2′—2′. Система Pr формируется, по-видимому, в раннем возрасте, поскольку при семейных обследованиях эти протеиды были обнаружены у всех 250 детей. Между системами Pr и Pa существует определенная взаимосвязь. Частота встречаемости четырех аллелей Pr^1, $Pr^{1'}$, Pr^2 и $Pr^{2'}$ для европеоидов, негроидов и монголоидов составляет соответственно: 64, 0,5; 8 и 27,5%; 70, 5, 8 и 17%; 77; 0; 0 и 23%.

Система Db [Azen E. A., Denniston C. L., 1974]. Эта система состоит из двух полос протеидов, которые либо присутствуют совместно (фенотип Db^+), либо оба отсутствуют (фенотип Db^-). Очевидно, имеется один локус с двумя аллелями, причем доминантный аллель отвечает за реализацию фенотипа Db^+. На основании отсутствия рекомбинаций между генами систем Db, Pr и Pa можно предположить, что локусы их сцеплены. Частота встречаемости аллелей Db^+ и Db^- среди европеоидов, негроидов и монголоидов составляет соответственно 12 и 88%; 56 и 44%; 7 и 93%.

Система Pm [Jkemoto S. et al., 1977]. По своей генетической структуре эта система аналогична системам Pa и Db: она представлена двумя аллелями, доминантным и рецессивным, с частотой встречаемости для японцев Pm^+ 38% и Pm^- 62%. Система характеризуется двумя фенотипами: белком, располагающимся при электрофорезе в кислом крахмальном геле в средней зоне между белками Pa и Pb, его наличие обусловлено действием доминантного аллеля Pm^+ и отсутствием этого белка, если человек гомозиготен по рецессивному аллелю Pm^-. Белок Pm обнаружен как в цельной слюне, так и в слюне из околоушной железы.

Система Ph [Jkemoto S. et al., 1979]. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия, в слюне околоушной железы был выявлен белок, отнесенный к ранее неизвестной генетически полиморфной системе Ph. Частота встречаемости фенотипа Ph(+) (наличие белка) среди японцев составляет 5%, фенотипа Rh(−) (отсутствие белка) — 95%. Семейные обследования свидетельствуют о том, что система

управляется двумя аллелями, доминантным и рецессивным.

Система Gl [Azen E. A. et al., 1978]. Полиморфизм этой системы определяется 5 аллелями одного локуса, из которых 4 — кодоминантные и структурные, а один — рецессивный, немой. Для европеоидов определены следующие генные частоты: Gl^1—74,2%, Gl^2—4%, Gl^3—15,5%, Gl^4—1,7%, Gl^0—4,6%. Каждый структурный ген обусловливает наличие одного специфического белка при электрофорезе в кислом полиакриламидном геле. Эта система насчитывает 11 групп. Показано сцепление локуса системы Gl с локусами систем Pr и Db.

Система R [Azen E. A. et al., 1979]. При изоэлектрофокусировании в слюне околоушной железы удалось определить белки, не связанные с ранее описанными системами собственных групп слюны. Генетический анализ показал, что эти белки относятся к одной системе и их синтез обусловливается двумя кодоминантными аллелями с частотой встречаемости для европеоидов $R^1=88\%$, $R^2=12\%$. Каждый аллель кодирует синтез двух белков. Эта система представлена также в слезах, молоке и лейкоцитах.

В настоящее время назрела необходимость рассмотреть некоторые организационные меры, направленные на повышение уровня экспертиз спорного отцовства. По нашему мнению, надо пересмотреть систему подготовки специалистов, занимающихся анализом вещественных доказательств; создать в республиканских бюро судебно-медицинской экспертизы специальное подразделение (отделение) для проведения экспертиз спорного происхождения детей; ограничить и строго регламентировать круг экспертных учреждений, проводящих подобные экспертизы. Проведение экспертиз спорного отцовства следует поручать лишь специалистам, имеющим хорошую специальную подготовку не только по лабораторной технике выявления серологических факторов, но и по вопросам наследования групповых антигенов различных эритроцитарных, сывороточных, ферментных и лейкоцитарных систем крови человека. Существующая в настоящее время система подготовки пока этого не предусматривает. Сосредоточение подобных экспертиз в республиканских бюро судебно-медицинской экспертизы позволит сконцентрировать в них силы и средства, необходимые для производства таких экспертиз на уровне современных требований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аржелас Л. К., Лутчева Е. С. О специфической активности гетероиммунных сывороток анти-Ze[a] и анти-Ze[b].—Труды Ленинградск. ин-та усовершенствования врачей, 1964, вып. 49, с. 137—138.

Ачеркан Н. Н., Любинская С. И., Туманов А. К. О методике определения типов эритроцитарной кислой фосфатазы в жидкой крови. — Суд. мед. эксперт., 1974, № 3, с. 23—25.

Барсегянц Л. О., Потапов М. И. О вероятной оценке в судебно-медицинской экспертизе спорного отцовства.—Суд. мед. эксперт., 1979, № 3, с. 31—34.

Бронникова М. А. К разрешению вопроса о спорном отцовстве. — В кн.: Вопросы судебной медицины. М., 1968, с. 277—279.

Бронникова М. А., Гаркави А. С. Методика и техника судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. — М.: Медицина, 1963.

Бронникова М. А., Гаркави А. С., Масис Т. М., Ульмер В. Э. К вопросу о групповой дифференцировке плодов человека (изосерологические системы АВ0, MN, P, Rh).—Суд. мед. эксперт., 1962, № 1, с. 31—36.

Бронникова М. А., Гаркави А. С., Масис Т. С., Ульмер В. Э. К вопросу об определении агглютиногенов изосерологической системы АВ0 и агглютиногена Р в тканях тела человеческих плодов. — Суд. мед. эксперт., 1963, № 1, с. 37—41.

Гладких А. С. Ферментные группы спермы: фосфоглюкомутазный и 6-фосфоглюконатдегидрогеназный полиморфизм.—В кн.: Всесоюзный съезд судебных медиков СССР. 1-й. Материалы. Киев, 1976, с. 496—498.

Гладких А. С. Гадакчян Д. Г. Изоферменты щелочной фосфатазы сыворотки крови и их роль в судебной серологии. — Суд. мед. эксперт., 1973, № 3, с. 21—25.

Гладких А. С., Тюрин А. В. Фенотипы ФГМ и их роль в судебно-медицинской экспертизе вещественных доказательств. — В кн.: Актуальные вопросы судебной медицины и патологической анатомии. Таллин, 1965, с. 195—197.

Гладких А. С., Тюрин А. В. Перспективы изучения ферментного полиморфизма в судебно-медицинском аспекте. — Воен.-мед. журн., 1976, № 1, с. 40—43.

Гладких А. С., Гадакчян Д. Г., Тюрин А. В. О возможности выявления групп ФГМ /К. Ф. 2.7.5.1/ в тканях и органах организма человека. — В кн.: Всесоюзный съезд судебных медиков СССР. 1-й. Материалы. Киев, 1976, 491—492.

Ильина Е. А. К методике получения сыворотки анти--Gc. — Суд. мед. эксперт., 1972, № 2, с. 28—30.
Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике. — Л.: Медицина, 1976.
Косяков П. Н. Иммунология изоантигенов и изоантител. — М.: Медицина, 1965.
Косяков П. Н. Изоантигены и изоантитела человека в норме и патологии. — М.: Медицина, 1974.
Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977.
Косяков П. Н., Трибулев Г. П. Иммунологический анализ клеток и тканей человека.—Журн. микробиол., 1937, № 2, с. 270—273.
Ларский Э. Г. Методы зонального электрофореза. — М.: Медицина, 1971.
Мишакова М. В. Способность гетероиммунных сывороток анти-Р выявлять агглютиноген Р в консервированной и неконсервированной крови, сохраняемой в жидком состоянии при разных температурных режимах. — Суд. мед. эксперт., 1962, № 4, с. 33—36.
Потапов М. И. Метод тройного определения эритроцитарных подгрупп A_1 — A_2 при помощи фитагглютининов. — Пробл. гематол., 1967, № 3, с. 13—16.
Потапов М. И. Современное состояние и основные особенности отечественной судебно-медицинской серологии. — Суд. мед. эксперт., 1972, № 4, с. 26—28.
Резина Н. А., Дубравская М. А. Еще раз о влиянии перелитой крови на определение групп крови реципиента.—Суд. мед. записки, 1971, № 5, с. 143—147.
Резникова М. Н., Баринова Л. И., Соловьева Н. И., Башлай А. Г. и др. Выявление в сыворотках крови людей антител к антигенам системы Gm.—Суд. мед. эксперт., 1968, № 1, с. 35—37.
Серопян А. К. Определение типовой принадлежности крови реципиента в судебно-медицинской практике. Научные труды Дагестанского мед. ин-та. 1956, т. 6, с. 379—381.
Сорокина Т. Т., Богданов Л. В. Изучение полиморфизма по щелочной фосфатазе сыворотки крови среди здоровых людей и больных шизофренией. — В кн.: Генетические и цитологические исследования ядерной и цитоплазматической наследственности. — Минск, 1973, с. 47—51.
Спицын В. А. Полиморфизм щелочной фосфатазы (Рр) сыворотки крови. — Вопр. антропод., 1978, т. 58, 76—84.
Спицын В. А., Ирисова О. В., Перевозчикова И. В. Генетико-антропологическая характеристика нганасан. — Вопр. антропол., 1976, т. 56, с. 53—58.
Таболин В. А., Вольтищев Ю. Е. О содержании общего белка и белковых фракций в сыворотке крови при гемолитической болезни новорожденных. — Вопр. охр. мат., 1964. № 5, с. 42—44.
Тимофеева В. Я. Случай исключения отцовства по эритроцитарной кислой фосфатазе. — Суд. мед. эксперт., 1978, № 1, с. 51—54.
Томилин В. В., Гладких А. С., Потапов М. И. Повышение эффективности судебно-медицинской экспертизы спорного отцовства на основе определения гаплотипов и генотипов. — Суд. мед. эксперт., 1980, № 2, с. 30—35.
Туманов А. К. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств. — М.: Юриздат, 1961.

Туманов А. К. Основы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. — М.: Медицина, 1975.
Туманов А. К. Сывороточные системы крови. — М.: Медицина, 1978.
Туманов А. К., Сахаров Р. С. Применение сывороточной системы Gm^a в судебно-медицинской практике вещественных доказательств.—Труды Ленинградск. ин-та усовершенствования врачей, 1966, вып. 49, с. 133—134.
Туманов А. К., Томилин В. В. Наследственный полиморфизм изоантигенов и ферментов крови в норме и патологии человека. — М.: Медицина, 1969.
Туманов А. К., Потапов М. И., Горянина Е. Е. Судебно-медицинская экспертиза спорного отцовства, материнства и замены детей, если нет в живых одного родителя или ребенка. — Суд. мед. эксперт., 1974, № 3, с. 25—27.
Туманов А. К., Масис Т. М., Юдина Г. С., Ильина Е. А. Использование особенностей системы MNSs при экспертизе замены детей. — Суд. мед. эксперт., 1972, № 3, с. 42—44.
Тюрин А. В. К методике электрофоретического разделения ферментов в полиакриламидном геле. — Воен.-мед. журн., 1976, № 8, с. 88—89.
Тюрин А. В. Судебно-медицинское использование полиморфизма фосфоглюкомутазы. — Суд. мед. эксперт., 1978, № 2, с. 36—38.
Умнова М. А., Ичаловская Г. А., Пискунова Т. М., Бейлина В. Б. «Кровяные химеры» и особенности серологической диагностики при массивных трансфузиях крови. — Пробл. гематол., 1969, № 6, с. 3—9.
Чарный В. И. К вопросу о влиянии перелитой крови группы 0/I/ на определение группы крови реципиентов.—В кн.: Вопросы судебно-медицинской экспертизы. М., 1954, с. 412—416.
Шаболтанова Д. Г. Влияние перелитой крови на групповую принадлежность крови реципиента. — Суд. мед. эксперт., 1973, № 2, с. 51—55.

Albrey I., Vincent E., Hutchinson I., March W. et al. A new antibody, anti-Fy 3, in the Duffy blood system. — Vox Sang (Basel), 1971, v. 20, p. 29.
Allen F., Lewis Sh. J. Kp^a (Penney) a new antigen in the Kell blood group system. — Vox Sang., 1957, v. 2, p. 81.
Allen F., Diamond L., Niedziela B. A new Blood group antigen — Nature, 1951, v. 167, p. 482.
Allen F., Krabbe M., Corcoran P. A new phenotype (McLeod) in the Kell blood-group system. — Vox Sang (Basel), 1951, v. 6, p. 555.
Allen F., Lewis J., Fudenberg H. Studies of anti-Kp^b (Rautenberg), a new antibody in the Kell blood-group system. Vox Sang, 1958, v. 3, p. 1.
Allen F., Corcoran P., Kenton H., Breare N. M^g, a new blood group antigen in the MNS system. — Vox Sang. (Basel), 1958, v. 3, p. 81.
Allison A. Genetic control of human haptoglobin synthesis. — Nature, 1959, v. 183, p. 1312.
Allison A., Blumberg B. An isoprecipitation reaction distinguishing human serum protein types. — Lancet, 1961, v. 1, p. 634.
Alper Ch., Propp R. Genetic polymorphism of the third component of human complements (C^13). — J. clin. Invest., 1968, v. 47, p. 2181.

Arfors K., Beckman L., Lundin L. Genetic variations of human serum phosphatases. — Acta genet. (Basel), 1963, v. 13, p. 89.
Azen E., Smithies O. Genetic polymorphism of $C^{1}3$ (β_1c-globulin) in human serum. — Science, 1968, v. 162, p. 905.
Bain B., Vas N., Lowenstein L. Reaction between leucocytes in mixed peripherial blood cells. — Fed. Proc., 1963, v. 22, p. 428.
Bamford K., Harris H., Luffman J. et al. Serum-alkaline-phosphatase and the AB0 blood-groups. — Lancet, 1965, v. 1, p. 530.
Baner G., Herbich J., Meinhardt K. Haufigkeit der Adenylatkinase-(AK) Typen in Wien und deren Brauchbarkeit und Beweiswert in der forensischen Serologie. — Wien. klin. Wschr., 1972, Bd 84, s. 369.
Bark J., Harris M., Firth M. Typing of the common phosphoglucomutase variants using isoelectric focusing — a new interpretation of the phosphoglucomutase system. — J. Forensic Sci., 1976, v. 16, p. 115.
Beckman L. Associations between human serum alkaline phosphatases and blood groups. — Acta genet. (Basel), 1964, v. 14, p. 286.
Bender K., Frank R. Esterase D-Polymorphismus: Darstellung in der Hochspannunggelektrophorese und Mitteilung von Allenlhaufigkeiten. — Humangenetik, 1974, Bd. 23, s. 315.
Benzad O., Lee C., Gavin J., Marsh W. A new anti-erythrocyte antibodi in the Duffy system: anty-Fy4 Submitted to "Vox Sang.", 1973, v. 23, p. 51.
Berach M., Hors J., Dausset J. A study of HL-A antigens in human organs. — Transplantation, 1970, v. 9, p. 185.
Berg K. A new serum tupe system in man—the LD system. — Vox Sang, 1965, v. 10, p. 513.
Berg K., Schwarzfischer F., Wischerath H. Esterase D polymorphism: Description of the "new" allele EsD^4. — Hum. Genetik, 1976, v. 32, p. 81.
Bhende Y., Deshpande C., Bhatia H. et al. A "new" blood-group character related to the AB0 system. — Lancet, 1952, v. I, p. 903.
Blake N., Saha N., McDermid E., Kirk R. Additional electrophoretic variants of 6-phosphogluconate dehydrogenase. — Humangenetik, 1974, v. 21, p. 347.
Blumberg B., Riddell N. Inherited antigenic differences in human serum beta-Lipoproteins. A second antiserum. — J. clin. Invest., 1963, v. 42, p. 867.
Booth P. Anti-N^a. An antibody sub-dividing Melanesian N. — Vox Sang, 1971, v. 21, p. 522.
Bosch C. van den. The very rare Rh genotype Ry (CdE/cde) in a case of erythroblastosis foetalis.—Nature, 1948, v. 162, p. 781.
Bouloux C., Comila J., Langaney A. Hemotypology of the Bedik. — Hum. Biol., 1972m, v. 44, p. 289.
Bowman J., Frischer H., Ajmar F. et al. Population, family and biochemical investigation of human adenylate kinase polymorphism. — Nature, 1967, v. 214, p. 1156.
Boyer S. Alkaline phosphatase in human sera and placenta. — Science, 1961, v. 134, p. 1002.
Brinkmann B. Erythrocytare Enzympolymorphism in der forensischen Serologie. Z. Rechtsmed., 1971, Bd 69, s. 83.
Brinkmann B., Püschel K. Forensischer Anwendungsbereich und Populationsgenetik der Enzympolymorphism Esterase D und Glyoxalase I. — Z. Rechtsmed, 1978, Bd 81, s. 181.

Buchanan D., Mc Intyre J. Consanguinity and two rare matings. — Brit. J. Haemat., 1955, v. 1, p. 304.
Bütler R., Brunner E. A new sensitive method for studying the polymorphism of the human low density lipoproteins. — Vox sang., 1966, v. II, p. 738.
Bütler R., Brunner E. On the genetics of the low density lipoprotein factors Ag(c) and Ag(e). — Hum. Hered., 1969, v. 19, p. 174.
Callender S., Sheila T., Race R. A serological and genetical study of multiple antibodies formed in response to blood transfusion by a patient with erythematosus diffusus.—Ann. Eugen., 1946, v. 13, p. 102.
Carter N., Fildes R., Finch L., Parr C. Genetically determined electrophoretic variantions of human phosphogluconate dehydrogenase.— Acta genet., 1968, v. 18, p. 109.
Ceppellini R., Dunn L., Turri M. An interaction between alleles at the Rh locus in man which weakers the reactivity of the Rho factor (D^u). — Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1955, v. 41, p. 283.
Ceppellini R., Ikin E., Mourant A. A new allele of the Rh gene E. — Boll. Ist sieroter. milan., 1950, v. 29, p. 123.
Chakraborty R., Swaw M., Schull W. Exclusion of paternity: The currents state of the art. — Am. J. hum. Genet., 1974, v. 26, p. 477.
Chen S. H., Giblett E. Polymorphism of soluble glutamicpyruvic transaminase: A new genetic marker in man. — Science, 1971, v. 173, p. 148.
Chen S.-H., Giblett E., Andersson J., Fossum B. Genetics og glutamic-pyruvic transaminase: its inheritance, common and rare variants, population distribution, and differences in catalytic activity. — Ann. hum. Genet., 1972, v. 35, p. 401.
Chown B., Kaita H. A "new" Kell blood group phenotype.—Nature, 1957, v. 180, p. 711.
Chown B., Lewis M., Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele. — Amer. J. hum. Genet., 1965, v. 17, p. 384.
Cleghorn T. The freguency of the Wr^a, By und M^g blood group antigens in blood donors in the south of Englad. — Vox Sang., 1960, v. 5, p. 556.
Cleve H., Kitchin F., Kirchberg G., Wendt G. A faster migrating Gc-variant: Gc Darmstadt. — Humangenetik, 1970, Bd 9, s. 26.
Colledge K., Pezzulich M., Marsh W. Anti-Fy5, an antybody disclosing a probable association between the Rhesus and Duffy blood group genes. — Vox Sang, 1973, v. 24, p. 193.
Connell G., Dixon G., Smithies O. Subdivision of the three common haptoglobin types based in "Hidden" differences. — Nature, 1962, v. 193, p. 505.
Constans J., Cleve H. Group-specific component. Report on the first international Workshop. — Humangenetik, 1979, Bd 48, S. 143.
Constans J., Viau M. Group-specific component: Evidence for two subtyps of gen Gc. 9. — Science, 1977, v. 198, p. 1070.
Coombs R., Mourant A., Race R. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh-agglutinins. — Brit. J. exp. Path., 1945, v. 26, p. 255.
Coombs R., Mourant A., Race R. In vivo isosensitization of red cells in babies with haemolytic disease. — Lancet, 1946, v. I, p. 264.
Corcoran P., Allen F., Lewis M., Chown B. A new antibodym anti-

K(anti-Peltz) in the Kell blood-group system. — Transfusion, 1961, v. I, p. 181.
Crawford M., Greenwalt T., Sasaki T. et al. The phenotype Lu (a-b-) together with unconventional Kidd groups in one family. — Transfusion, 1961, v. I, p. 228.
Crome W. Über Blutgruppenfragen: Mutter M., Kind N.—Z. ges. recht. gren., 1935, Bd 24, s. 267.
Gutbush M., Chanarin J. The expected blood-group antibody anti-Ku^b. — Nature, 1956, v. 178, p. 855.
Cutbush M., Mollison P. The Duffy brood group system. — Heredity, 1950, v. 4, p. 383.
Dahr P. Unterscheidung der Untergruppen A_1 und A_2 mit $Alpha_2$ — (Anti-O-) Agglutinin enthaltenden Hundeseren. — Klin. Wschr., 1939, Bd 18, s. 806.
Darnborough J., Firth R., Giles C. et al. A "new" antibody anti-Lu^a Lu^b and two further examples of the genotype Lu(a-b-).— Nature, 1963, v. 198, p. 796.
Dausset J. Iso leuco-corps. — Acta haemat, 1958, v. 20, p. 256.
Dausset J. Lymphocytotoxicity typ Manual of tissue typing techniques. — Bethesda, 1968, 1—2.
Dausset J. Micro-lymphocytotoxicity technique. Manual of tissue typing techniques. — Bethesda, 1970, 16—22.
Dausset J. Le complexe chromosomique HL. — Nouv. Presse. Med., 1973, v. 2, p. 2023.
Doichinova N., Kourteva B. False blood group determination after massive transfusions. — Folia haemat., 1969, v. 92, p. 3.
Du Chense A., Ritter I., Lehmann R. et al., Beitrag zur Populations— und Formalgenetik der Isoenzympolymorphismen saure Erythrozytenphosphatase (SEP), Phosphoglucomutase (PGM), Adenylatkinase (AK), Adenosindesaminase (ADA) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). — Krim. forens. Wiss., 1974, Bd 17, s. 171.
Dunsford I., Ikin E., Mourant A. A human blood group gene intermediate between M and N. — Nature, 1953, v. 172, p. 688.
Dykes D., Polesky H. Paternity testing by using erythrocyte esterase D. — J. forens. Sci., 1977, v. 22, p. 173—177.
Eichmann K., Deicher H., Cleve H. Immunologische Analyse der Beziehungen zwischen den drei verschiedenen Typen von Antigendeterminanten normaler menschlicher Haptoglobine. — Humangenetik, 1966, Bd. 2, s. 271.
Fiedler H., Pettenkofer H. Ein "neuer" Phanotyp in Isoenzymsystem der Phosphoglucomutasen des Menschen (PGM_1-O) I Mitt. — Blut, 1968, Bd. 18, s. 33.
Fildes R., Harris H. Genetically determined variation of adenylate kinase in man. — Nature, 1966, v. 209, p. 261.
Fildes R., Parr C. Human red cell phosphogluconate dehydrogenase.— Nature, 1963, v. 200, p. 890.
Francis B., Hatcher D. MN blood types. The S-s-U^+ and M_1 phenotypes. — Vox Sang., 1966, v. II, p. 213.
Furuhjelm U., Nevanlinna H., Gavin I., Sanger R. A rare blood group antigen An^a (Ahonem). — J. med. Genet, 1972, v. 9, p. 385.
Galatins-Jensen F. Rare phenotypes in the Hp-system. — Acta genet., 1958, N 8, p. 248.
Gavioli A., Tonon E. Limpiego del sistema HL-A in casi disclusione di paternita. — Transfus. Sang., 1973, v. 14, p. 427.

Gershowitz H., Fried R., Anti-M^v, a new autibody of the MNSs blood group system. — Amer. H. jum. Genet., 1966, v. 18, p. 264.
Ghosh A. Polymorphism of red cell glyoxalase I. — Human genetik, 1977, v. 30, p. 91.
Giblett E. Haptoglobin types in American negroes. — Nature, 1959, v. 183, p. 192.
Giblett E. Variant haptoglobin phenotypes. In: Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1964, v. 29, p. 321.
Göhler W. Genetische Untersuchungen zum Gm-System. — Leipzig, 1966.
Grubb R. Agglutination of erythrocytes coated with "incomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. The existence of human serum groups. — Acta path. microbiol. scand, 1956, v. 39, p. 195.
Grubb R. A notation for the Gm groups. — Nature, 1961, v. 189.
Grubb R., Laurell A. Hereditary serological human serum groups. — Acta path. microbiol. scand., 1956, v. 39, p. 390.
Gullbring B. Investigation on the occurrence of blood group antigens in spermatozoa from man and serologicae demonstration of the segregation of characters. — Acta med. scand., 1957, v. 159, p. 169.
Haferland W. Bemerkungen zur Nomenklaturfrage der Blutgruppen unter Berucksichtigung einer Stellungnahme von Dr. Alexander Wiener, Brooklyn.—Z. arztl. Fortbild., 1965, Bd 59, s. 197.
Hart M. van der, Bosman H. Two rare human blood group antigens. — Vox Sang, 1954, v. 4, p. 108.
Heistó H., Vogt E., Heier A. A case of anti-Cellano. — In: P. H. Andresen, Papers in dedication. Copenhagen, 1957.
Henningsen K. A family study involving a new rare Rh-Chromosome (d—— or———) — In: International longress on blood Transfusion. 7-th. Proceedings. Basel, 1958, 667.
Henningsen K. Exceptional MNSs- and Gm-types within a Danish family. — Acta genet., 1966, v. 16, p. 239.
Herbich J., Fischer R., Hopkinson D. Atypical segregation of human red cell acid phosphatase phenotypes: evidence for a rare "silent" allele P^0. — Ann. hum. Genet., 1970, v. 34, p. 145.
Hirschfeld J. Immuno-electrophoretic demonstration of gualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. — Acta path. microbiol. scand., 1959, v. 47, p. 160.
Hirschfeld J. Immunoelectrophoresis-procedure and application to the study of group-specific variations in sera. — Science Tools, 1960, v. 7, p. 18.
Hirschfeld J. The Gc-system. — Progr. Allergy, 1962, v. 6, p. 1.
Hirschfeld J. Some notes on the Rh-system. A complex-complex model. — Vox Sang, 1973, v. 24, p. 21.
Hirschfeld J., Rittner Ch., Geserick G. Inheritance of the Ag(x) and Ag(y) antigens. — Vox Sang., 1968, v. 14, p. 124.
Hirschorn E., Bach F., Kolodney F. et al. Immune response und mitosis of Hu, an peripherial blood. Lumphocytes in vitro. — Science, 1963, v. 142, p. 1185.
Hopkinson D., Mestriner M., Cortner J., Harris H. Esterase D: a new human polymorphism. — Ann. hum. Genet., 1973, v. 37, p. 119.
Hopkinson D., Spencer N., Harris H. Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. — Nature, 1963, v. 199, p. 969—971.
Hoppe H. H., Hennig W., Brinkmann B. Horizontal polyarcrilamide

electrophoresis for the determination of serum protein (haptoglobin) and red cell enzyme polymorphisms. — Humangenetik, 1972, Bd 4, s. 224.

Hossaini A., Allison M., Khorani A. Distribution of HL-A antigenes and ABO blood group in pre Colombian human. — J. Reticuloendoth. Soc., 1975, v. 18, Suppl. 3, p. 8.

Hoste B. Group-specific component (Gc) and transferrin (Tf) subtyps certain bay isoelectric focusing. Simple nonimmunological staining procedure for Gc. — Hum. Genet., 1979, v. 50, p. 75.

Hulten M., Lindsten J., Ming Pen-Ming L. et al. Possible localization of the genes for the Kidd blood group on an autosome involved in a reciprocal translocation. — Nature (Lond), 1966, v. 211, p. 1067.

Hummel K. Die inkompletten Aktikorper in der Immunobiologie. — Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1955.

Hunter L., Lewis M., Chown B. A further example of Kidd (Jk^a) haemagglutinins. — Nature, 1951, v. 168, p. 790.

Ikin E., Mourant A. Rare blood group antigen in negroes. — Brit. med. J., 1951, 456.

Ikin E., Mourant A., Pettenkofer H., Blumenthal G. Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fy^b.—Nature, 1951, v. 168, p. 1077.

Jack J., Tippet P., Noades J., Sanger R. A subdivision of the human blood group antigen M. — Nature, 1960, v. 186, p. 642.

Johnson A., Cleve H., Alper C. Variant of the groupspecific component system as demonstrated by immunofixation electrophoresis. Report of new variant. — Amer. G. Hum. Genet., 1975, v. 27, p. 728.

Jungwirth J. Problematische Rhesusausschlusse. — Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1967, Bd. 59, s. 164.

Khan P., Doppert B. Rapid detection of glyoxalase I (GLO) on cellullose acetate gel and the distribution of GLO variants in a Dutch population. — Hum. Genet., 1976, v. 34, p. 53.

Kissmeyer-Nielsen F., Svejgaard A. Crossing-over within the HL-A System — Nature, 1969, v. 224, p. 75.

Kitchin F. Demonstration of the inherited serum groupspecific protein by acrilamid electrophoresis. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1965, v. 119, p. 1153.

Klenk E., Uhlenbruck G. Uber die Abspaltung von N-Glykolylneuraminsaure (P-Sialinsaure) aus dem Schweinesubmaxillarismucin durch das "receptor destroying enzyme". — Zschr. physiol. Chem., 1957, Bd 307, s. 266.

Kömpf J. Zytoplasmatische Glutamat — Pyruvat — Transaminase (EC: 2.6.1 2): Bestimmungstechnik. — Arztl. Lab., 1972, Bd 18, s. 25.

Kömpf J., Bissbort S., Gussmann S., Ritter H. Polymorphism of red cell glyoxalase I (E. C.: 4.4.1.5). A new genetic marker in man.— Humangenetik, 1975, Bd 27, s. 141.

Kornstad L., Heistö H. 6-th Congress of the European Society of haematology. Copenhagen, August 26th—31 th 1957, p. 154.

Köster B., Leupold H., Mauff G. Ecterase D-Polymorphismus: Agarosogel-Hochspannungs-elektrophorese und Verteilung der phänotypen in verschiedenen europaischen Populationen. — Humangenetik, 1975, Bd 28, s. 75.

Koziol P., Dobosz T. GLO polymorphism in two polish population samples. — Hum. Genet., 1978, v. 45, p. 77.

Kühnl P., Spielmann W. Transferrin: Evidence for two common subtypes of the Tf^c allele. — Hum. Genet., 1978, v. 43, p. 91.
Kühnl P., Spielmann W. A third common allele in the transferrin System, Tf^{c3}, detected by isoelectric focusing. — Hum. Genet., 1979, v. 50, p. 193.
Kühnl P., Schmidtmann U., Spielmann W. Evidence for two additional common allels at the PGM_1 locus (phosphoglucomutase E. C. 2.7.5.1).—Hum. Genet., 1977, v. 35, p. 219.
Kühnl P., Schwabenland R., Spielmann W. Investigations on the polymorphism of glyoxalase I (E. C. 4.4.1.5) in the population of Hessen, Germany. — Hum. Genet., 1977, v. 38, p. 99.
Kühnl P., Spielmann W., Weber W. Isoelectric focusing of rare trasferrin (Tf) variants and common Tf^c subtypes. — Hum. Genet., 1979, v. 46, p. 83.
Lamm L., Fridrich V. Assigument of the major histocompatibility complex to chromosome 6 in a family with a paracentric inversion. — Human Hered., 1974, v. 24, p. 275.
Lamm L., Kismeyer-Nielson F., Svejgaard A. et al. On the orientation of the HLA region and PGH3 locus in the chromosome 6— Tissue antigens, 1972, v. 2, p. 205.
Landsteiner K., Levine P. A new agglutinable factor differentiating individuale human bloods. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1927, v. 24, p. 600.
Landsteiner K., Levine P. Further observations on individual differences of human blood. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1927, v. 24, p. 941.
Landsteiner K., Strutton W., Chase M. An agglutination reaction observed with some human bloods, chiefly amond negroes. — J. Immunol., 1934, v. 27, p. 469.
Langmann M., Leuthold E., Robson E. et al. Influence of deet on the "intestinal" component of serum alkaline phosphatase in people of different ABO blood groups and secretor status. — Nature. 1966, v. 212, p. 41.
Lauer A. Die Vererbungsweise in Rh-System. — Blut, 1964, Bd 10, s. 99.
Laurell C. B. Antigen-antibody crossed electrophoresis. — Analyt. Biochem., 1965, v. 10, p. 358.
Lawler S., Bertinshaw D., Sanger R., Race R. Inheritance of the Rh blood groups: 150 families tested with anti-C, c, C^w, D, E, e. — Ann. Eugen., 1950, v. 15, p. 258.
Levine P., Backer M., Wigod M., Ponder R. A new human hereditary blood property (Cellano) present in 99,8% of all bloods. — Science, 1949, v. 109, p. 464.
Levine P., Kuhmichel A., Wigod M., Koch E. A new blood factor s, allelic to S. — Proc. Soc. exper. Biol., 1951, v. 78, p. 218.
Levine P., Robinson E., Pryer B., Michei O. Anti-Tj^a in second pair of U. S. sibs with observations on the original sibs.—Vox Sang., 1954, v. 3, p. 143.
Lewis M., Kaita H., Chown B. The Duffy blood system in Caucasians.— Vox Sang., 1972, v. 23, p. 523.
Loghem I., van., van der Hart M. The weak antigen A_4 occurring in the offspring of group O parents. — Vox Sang., 1954, v. 4, p. 69.
Luczkiewicz-Muleczykowa A. Anti-Gm(a) rabbit immune sera. — Arch. Immunol., 1964, v. 12, p. 429.

Lundsvall J. The development of factor Gm(x) after birth. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1965, v. 17, Suppl. 84, p. 246.

Mainwaring U., Pickles M. A further case of anti-Lutheran immunization with some studies on its capacity for human sensitization.—J. clin. Path., 1948, v. 1, p. 292.

Mann J., Cahan A., Gelb A. et al. A sec linked blood groups. — Lancet, 1962, v. 1, p. 8.

Marsh D., Bias N., Susan H., Goodfriend L. Association of the HL-A-A7 cross-react on group with a specific reaginic. — Science, 1973, v. 179, p. 691.

Matson G., Swanson J., Noades J. et al. A "new" antigen and antibody belonging to the P blood group system.—Amer. J. hum. Genet., 1959, v. II, p. 26.

Matsunaga E., Omoto K., Shinoda T., Matsuda E. et al. A further study on the family with anomalous inheritance of haptoglobin types.—Jap. J. hum. Genet., 1970, v. 15, p. 166.

Mauff G., Bender K., Fischer B. Genetic polymorphism of the fourth component of human complement. — Vox Sang., 1978, v. 34, p. 296.

Mauff G., Potrafki B., Freis H., Pulverer G. Verleichende Untersuchungen zum Polymorphismus des Posttransferrins (Pt) und der dritten Komponente des Humankomplemnts (C3)—Humangenetik, 1974, Bd 21, s. 75.

Mayr W. The genetics of HLA system A study of population and families and its application paternity cases. — Humangenetik, 1971, Bd 12, s. 195.

Mayr W. Graundlagen zur Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlich'eit. — Z. Immun. — Forsch., 1972, Bd 144, s. 18.

Mayr W., Hiller Ch. Zum Bewiesweit von Vaterschaftsausschlusen im HL-A-System. — Folia haemat. (Leipzig), 1974, v. 101, p. 422.

Metaxas M., Metaxas-Bühler M., Ikin E. Complexities of the MN locus. — Vox Sang., 1968, v. 15, p. 102.

Metaxas-Bühler M., Metaxas M., Giles C. A Swiss family showing inheritance of the Swann antigen with Lu^a. — Vox Sang., 1972, v.23, p. 429.

Mohr J. The Lutheran-secretor linkage: estimation from combined available data.—Acta genet. (Basel), 1963, v. 13, p. 334.

Mollison P. The survival of transfused erythrocytes in haemolytic disease of the newborn. — Arch. Dis. Childh., 1943, v. 18, p. 161.

Morganti G., Beolchini P., Bütler R. et al. Contribution to the genetics of serum β-lipoprotein in man. VI. Evidence for the existence of the $Ag^{t/z}$ locus, closely linked to the $Ag^{x/y}$, $Ag^{a'/d}$ and $Ag^{e/g}$ loci. — Humangenetik, 1972, Bd 16, p. 307.

Morton N., Krieger H., Steinberg A., Rosenfield R. E. Genetic evidence confirming the localization of Sutter in the Kell blood-group system. — Vox Sang., 1965, v. 10, p. 608.

Nezbeda P. Occurence of the ACP_1^0 allele in Czechoslovakia.—Hum. Genet., 1979, v. 46, p. 227.

Nunn H., Giles C., Dormandy K. A second example of anti-Ku in a patient who has the rare Kell phenotype, K^0. — Vox Sang., 1966, v. 11, p. 611.

Olaisen B. Redeutung des GPT-Systems in Vaterschaftsfällen.—Humangenetik, 1975, Bd 25, s. 204.

Olaisen B., Teisberg P., Jonassen R., Goedde-Dahl T. The C4 system.

Formal and population genetics. — Hum. Genet., 1979, v. 50, p. 187.
Pals G., Pronk J. Genetik variation in parotid basic proteins (Pb) in the Bozo (Mali, West Africa). — Hum. Genet., 1979, v. 49, p. 355.
Parkin B., Adams E. The typing of esterase D in human bloodstains.— Med. Sci. Law., 1975, v. 15, p. 102.
Pietrusky F. Über eingeengte Seren und über andere Untersuchung methoden zum Nachweis des Schwachen N-Rezeptors (N_2) im Blute. — Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1937, Bd 28, s. 468.
Pinkerton F., Mermod L., Liles B. A. et al. The phenotype Jk (a—b—) in the Kidd blood group system. — Vox Sang., 1959, v. 4, p. 155.
Plaut G., Ikin E., Moovant A. et al. A new blood group antibody, anti-Jk^b. — Nature (Lond.), 1953, v. 171, p. 431.
Polonovski M., Jayle M. Existence dans le plasma ganguin d'une substance activantlaction peroxydasique de l'hemoglobine. C. R. Soc. Biol., 1938, v. 129, p. 457.
Popivanov R., Vulchanov V. Segregation of man's AB-group spermatozoa in A- and B-spermatozoa through agglutination with immune anti-A rabbit serum. — Z. Immun. — Forsch., 1962, v. 124, p. 206.
Poulik M. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. — Nature, 1957, v. 180, p. 1477.
Prokop O., Bundschuh G. Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen im Klinik und Gerichtsmedizin. — Berlin: Walter de Gruyter, 1963.
Prokop O., Göhler W. Die menschlichen Blutgruppen VEB. — Jena: Gustav Fischer Verlag, 1976.
Prokop O., Rackwitz A. Beweis für die Existenz eines "neuen" Gc-Gens, aufgedekt durch eine anscheinend inkompatible Mutter—Kind—Paarung: Mutter Gc 1-1, Kind Gc 2-2. — Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1968, Bd 62, s. 261.
Prokop O., Schneider W. Das Rhesusmosaik R_1.—Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med., 1960, Bd 50, s. 423.
Prokop O., Uhlenbruck G. Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. 2 Auf. — Leipzig: VEB Georg Thieme, 1966.
Prokop O., Vámośi M. Die A-Untergruppenbestimmung mit menschlichem Speichel. — Z. ges. Hyg., 1965, Bd II, s. 171.
Race R., Sanger R. Blood groups in man. 4th ed. — Oxford,: Blackwell, 1962.
Race R., Sanger R., Lawler S. Rh gene allelomorphic to C. — Nature, 1948, v. 161, p. 316.
Race R., Sanger R., Levine P. et al. A position effect of the Rh blood group genes. — Nature, 1954, v. 174, p. 460.
Race R., Sanger R., Selwyn J. A probable deletion in a human Rh chromosome. — Nature, 1950, v. 166, p. 520.
Radam G., Strauch H. Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrocytenphosphatase. — Z. klin. Chem., 1966, Bd 4, s. 234.
Radam G., Strauch H. Populationsgenetik der Adenylatkinase (EC 2.7.4.3). — Humangenetik, 1968, Bd 6, s. 90.
Radam G., Strauch H. Die Darstellung der Phosphoglucomutasevarianten. — Arztl. Lab., 1969, Bd 15, s. 7.
Radam G., Strauch H. Beitrag zur Populationsgenetik der Adenosindesaminase. — Humangenetik, 1971, Bd 12, s. 173.
Reinskou T. A heterogeneity of the fast moving component of the Gc-system. — Acta path. microbiol. scand., 1963, v. 59, p. 526.

Reinskou T. Distribution of the Gc types in Norway. — Acta Genet. (Basel), 1965, v. 15, p. 33.
Renkonen K. Studies in hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of leguminosae. — Ann. Med. exp. Fenn., 1948, v. 26, p. 66.
Rex-Kiss B., Horvath E. Ergebnisse der Blut- und Serumgruppen—Bestimmungen in Ungarn (Phanotypen—Genotypen- und Genfrequenzen). — Z. Immun. Allergie — Forsch., 1971, Bd 141m, S. 449.
Ritter H. Zur farmalen Genetik des Duffy-System. Untersuchung von 247 Familien. — Humangenetik, 1967, Bd 4, S. 59.
Ritter H., Krah E., Schwarzfischer F., Baitsch H. Zum forensischen Beweiswert des InV-Polymorphismus; das Merkmal inV. I. — Anthropol. Anz., 1965, Bd 29, S. 196.
Ritter H., Schmidtmann E. Das anti-inv-I-Rie. — Humangenetik, 1964, Bd I, s. 144.
Rittner Ch. Weber W. Evidence for a "Silent allele" GLO^0 at the Glyoxalase I locus. — Hum. Genet., 1978, v. 42, p. 315.
Ropartz C., Lenoir J., Rivat L. A new inheritable property of human sera: the InV factor. — Nature, 1961, v. 189, p. 586.
Ropartz C., Rivat L., Rousseau P. Y. Deux nouveaux facteurs dans les systems hereditaices de gamma-globuline: le Gm(e) et l'InV(I). — In: International Society Blood Transfusion. 9th congress. — Proceedings. Basel, 1964, p. 455—458.
Ropartz C., Rivat L., Rousseau R. V. et al. Utilisation de globules rouges tannés et revêtus de B c pour tenter de définir un nouveau polymorphisme sérique humain (Mise en evidence d'anti-B_1 c d'origine humaine). — Transfusion, 1965, v. 8, Suppl. I, p. 317.
Ropartz C., Rousseau P. Y., Rivat L. Hypothéses sur la genetique formelle du systeme Gm chez les Caucasiens. — Humangenetik, 1965, Bd I, s. 483.
Rose M., Geserick G. Ein neuer Serumpolymorphismus: Pt. Erste Hinweise fur eine genetische Steuerung. — Acta biol. med. germ., 1969, Bd 3, s. 351.
Rosenfeld S., Ruddy S., Austen K. Structural polymorphism of the fourth component of human complement. — J. clin. Invest., 1969, v. 48, p. 2283.
Sahai S., Srivastava N., Goel B., Srivastava L. Distribution of C3 phenotypes in North India: a pilot study. — Hum. Genet., 1978, v. 47, p. 335.
Salmon Ch., Seger J., Mannoni P. Une population dérythrocytes avec anomalie simultanee des phenotypes induits par les genes des lokus ABO et adenylate kinase. — Rev. franc. etud. Clin. Biol., 1968, v. 13, p. 296.
Sanger R. An association between the P and Jay systems of blood groups. — Nature, 1955, v. 176, p. 1163.
Sanger R., Jack J. A. The Duffy blood groups of New-York Negroes. The phenotyp Fy (a—b—). — Brit. J. Haemat., 1955, v. I, p. 370.
Sanger R., Rosenfield R., Vogel P. A serum containing anti-s and anti-Jk^b. — Vox Sang., 1953, v. 3, p. 71.
Schiff F. Über den serologischen Nachweis der Blutgruppeneigenschaft O — Klin. Wschr., 1927, Bd 6, s. 303.
Schmechta H. Zum Polymorphismus der Esterase D der Erythrozyten, Phänotypenverteilung und Genfrequenz in einer Stichprobe. — Dtsch. Gesundh. — Wes., 1977, Bd 32, s. 1138.

Seigler H., Metzgar R. Embryonic development of human Transplantation antigens. — Transplantation, 1969, v. 9, p. 478.
Seyfried H., Walewska I., Werblinska B. Unusual inheritance of ABO group in a family with weak B antigens. — X Vox Sang., 1964, v. 9, p. 268.
Shapiro M. Serology and genetics of a new blood factor: hr^s (Southafrican). — J. forens. Med., 1960, v. 7, p. 96.
Simmons R. X-linked blood groups, Xg, in Australian aborigines and New Guineans. — Nature, 1970, v. 227, p. 1363.
Sinclair M., Buchanan D., Tippett P., Sanger R. Another antibody related to the Lutheran blood groop system (Much). — Vox Sang., 1973, v. 25, p. 156.
Slepicka L., Bartova A. Informativni Hodnotamatickno wodnoceni peternitrich sporu. — Soud. Lek., 1973, v. 18, p. 25.
Smithies O. Variations in human serum β-globulins. — Nature, 1957, v. 180, p. 1482.
Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. — Biochem. J., 1955, v. 61, p. 629.
Solheim B., Thorsby E. Beta-2-Microglobulin part of the HL-A molecule in the Lymphocyte membrane. — Nature, 1974, v. 249, p. 36.
Sonneborn H. H., Renninger W. Adenylatkinase—Untersuchung. Eine populationsgenetische Untersuchung mit Celluloseacetatfolien-Elektrophorese. — Arztl. Lab., 1971, Bd 17, s. 54.
Speiser P. Das Blutkorperchenmerkmal Ss. — Blut, 1955, Bd I, S. 185.
Spencer N., Hopkinson D., Harris H. Phosphoglucomutase polymorphism in man. — Nature, 1964, v. 204, s. 742.
Spencer N., Hopkinson D., Harris H. Adenosine deaminase polymorphism in man. — Ann. Hum. Genet., 1968, v. 32, p. 9.
Spielmann W., Schilling L., Teixidor D. Genfrequenzen und Vererbung im Duffy-System. — Humangenetik, 1968, Bd 6, s. 200.
Spielmann W., Cwosdz E., Muller H., Teixidor D. Gen-Frequenzen und Vererbung im Kidd-System. — Klin. Wschr., 1966, Bd 44, s. 788.
Spielmann W., Kühnl P., Rexrodt Ch., Hänsel G. Untersuchungen zum GPT-System unter besonderer Berucksichtigung des stummen Allels PGT^0. — Humangenetik, 1973, Bd 18, s. 341.
Steinberg A., Wilson J., Lanset S. A new human gamma globulin factor determined by an allele at the Inv locus. — Vox Sang., 1962, v. 7, p. 151.
Stratton F. A new Rh allelomorph. — Nature, 1946, v. 158, p. 25.
Stratton F., Renton P. Haemolytic disease of the newborn caused by a new Rh antibody, anti-C^x. — Brit. med. J., 1954, 962.
Stroup M., Macilroy M., Walker R., Aydelotte I. Evidence that Sutter Belong to the Kell blood group system. — Transfusion, 1965, v. 5, p. 309.
Struijk A., Wurzer-Figurelli E., Ajmar F., Khan P. The distribution of esterase D variants in different ethnic groups. — Hum. Genet., 1976, v. 34, p. 299—306.
Suzuki T., Kashimura S., Umetsu K., Kudo T. Esterase D phenotypen in north-eastern Japan. — Z. Rechtsmed., 1978, Bd 81, s. 119.
Sveigaard A., Kissmeyer-Nielsen. Cross. reactive Human HL-A Isoantibodies. — Nature, 1968, v. 219, p. 868.

Teisberg P., Akesson I., Olaisen B. et al. Genetic polymorfism of C4 in man and localisation of a structural C4 locus to the HLA gene complex of chromosome 6. — Nature, 1976, v. 264, p. 253.
Terasaki P. Microdroplat lymphocyte cytotoxicity test manual of tissue typing techniques. — Bethesda, 1970, 42.
Thymann M. Identification of a new serum protein polymorphism as transferrin. — Hum. Genet., 1978, v. 43, p. 225.
Tippett P. A case of suppressed Lu^a and Lu^b antigens. — Vox Sang., 1971, v. 20, p. 378.
Tsuji T., Weissmann J. Agarose-Dunnschicht—Elektrophorese zur Bestimmung der erythrozytaren Adenylatkinase (EC 2.7.4.3). — Polymorphismen. — Arztl. Lab., 1976, Bd 22, s. 363.
Vetter O., Wegner H. A further case of anti-Fy^b and the frequency of Duffy antigens of the city of Leipzig. — Acta genet., 1967, v. 17, p. 338.
Vignon H., Le Petit J. Problemes de transfusions massives on repelees. — Ann. Anesth. franc., 1968, v. 9, special N 2, p. 1241.
Vos G. The serology of Tj^a-like haemolysins observed in the serum of threatened aborters in Western Australia.. — Acta haemat. (Basel), 1966, v. 35, p. 272.
Walch R., Montgomery C. A new human isoagglutinin subdividing the MN blood groups. — Nature, 1947, v. 160, p. 504.
Walker R., Argall C., Steanc E. et al. Is^b of the Sutter blood group system. — Transfusion, 1963, v. 3, p. 94.
Waller M., Vanghan J. Use of anti-Rh sera for demonstrating agglutination activating factor in rheumatoid arthritis. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1956, v. 92, p. 198.
Warnock M. Characterization of tissue and serum alkaline phosphatase. — Clin. chim. Acta, 1966, v. 14, p. 156.
Welch S., Swindlehurst C., Mc Gregor I., Williams K. Isoelectric focusing of human red cell phosphoglucomutase. — Hum. Genet., 1978, v. 43, p. 307.
Wendt G., Ritter H., Zilch I. Problematischer Mutter—Kind—Ausschlus mit PGM. — Hum. Genet., 1971, Bd 13, s. 350.
Wiener A. Distribution and heredity of variants of the Rh types. — Science, 1943, v. 98, p. 182.
Wiener A., Gordon E. A hitherto undescribed human blood group Am. — Brit. J. Haemat., 1956, v. 2, p. 305.
Wiener A., Wexler I. Die Vererbung der Blutgruppen. — Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1960.
Wiener A. Nomenclature nightmare. — Blood, 1953, v. 8, p. 761.
Wiener A., Geiger J., Gordon E. Mosaic nature of the Rh_a factor of human blood. — Exp. Med. Surg., 1957, v. 15, p. 75.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3

Раздел I. **ИЗОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА** 5

Глава 1. **Система АВ0** 5

Глава 2. **Система MNSs** 15

Глава 3. **Система Р** 20

Глава 4. **Система резус** 23

Глава 5. **Система Келл—Челлано** 49

Глава 6. **Система Лютеран** 53

Глава 7. **Система Даффи** 57

Глава 8. **Система Кидд** 60

Глава 9. **Система Xg** 62

Раздел II. **СЫВОРОТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ** . . . 66

Глава 10. **Система гаптоглобина** 66

Глава 11. **Системы иммуноглобулинов** 75

Система Gm 80

Система InV 98

Глава 12. **Система группоспецифического компонента (Gc)** 103

Глава 13. **Системы липопротеинов** 115

Система Ag 116

Система Ld 120

Глава 14. **Система трансферрина** 121

Глава 15. **Система С3 (посттрансферринов)** 129

Глава 16. **Система С4** 135

Раздел III. **ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ** 142

Глава 17. **Система эритроцитарной кислой фосфатазы** . 143

Глава 18. **Система эритроцитарной фосфоглюкомутазы** . 148

Глава 19. **Система эритроцитарной аденилаткиназы** . . 158

Глава 20. **Система эритроцитарной фосфоглюконатдегидрогеназы** 165

Глава 21. **Система эритроцитарной аденозиндезаминазы** 170

Глава 22. **Система эритроцитарной глутамат-пируват-аминотрансферазы** 175

Глава 23. **Система эритроцитарной эстеразы D** . . . 181

Глава 24. **Система эритроцитарной глиоксалазы I** . . 185

Глава 25. **Система щелочной фосфатазы сыворотки крови человека** 189

Раздел IV. **СИСТЕМА АНТИГЕНОВ HLA** 197

Раздел V. **ГРУППЫ КРОВИ И ГЕМОТРАНСФУЗИЯ** . . . 206

Раздел VI. **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ СИСТЕМ КРОВИ** 210

Список литературы 226

1р.50к.

Медицина

Судебно-медицинское исследование крови